

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Medizinische Fakultät
Institut für Molekulare Zellbiologie

„Charakterisierung PI3K γ -assoziierter Proteinkomplexe im
Immunsystem“

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplombiologin Katja Lehmann
geboren am 22. September 1975 in Karl-Marx-Stadt

Jena, im Juni 2006

Gutachter:

1. Prof. Dr. Reinhard Wetzker, FSU Jena
2. Prof. Dr. Johannes Norgauer, FSU Jena
3. Prof. Dr. Gunter Fischer, MPG Halle

Tag der Doktorprüfung: 28.06.2006

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.07.2006

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)	1
1.1.1	Die Klasse I der Phosphoinositid-3-Kinasen	2
1.1.1.1	Klasse IA der Phosphoinositid-3-Kinasen	3
1.1.1.2	Klasse IB der Phosphoinositid-3-Kinasen	4
1.2	3-Phosphoinositide als second messenger und 3-Phosphoinositid-bindende Domänen	7
1.2.1	Die FYVE-Domäne	7
1.2.2	Die PX-Domäne	7
1.2.3	Die ENTH-Domäne	8
1.2.4	Die PH-Domäne	8
1.2.5	Akt als Effektor der PI3K-Lipidkinaseaktivität	8
1.2.6	Regulation der PI3K-Lipidkinaseaktivität	9
1.3	Funktionen von PI3K γ im Immunsystem	10
1.3.1	Funktionen von PI3K γ im adaptiven Immunsystem	10
1.3.2	Funktionen von PI3K γ in Mastzellen	11
1.3.3	Funktionen von PI3K γ in neutrophilen Granulozyten	11
1.3.3.1	PI3K γ und Chemotaxis	12
1.3.3.2	PI3K γ und die ROS-Produktion	13
1.4	Proteinkinase C	15
1.4.1	Die C1-Domäne der PKCs	16
1.4.2	Die C2-Domäne der PKCs	16
1.4.3	Die katalytische Domäne der PKCs	17
1.4.4	Reifung und Aktivierung von cPKCs	17
1.4.5	PKC-interagierende Proteine	18
1.4.6	Funktionen von PKCs	19
1.4.6.1	Funktionen von PKCs in neutrophilen Granulozyten	19
1.4.6.2	PKC-Isoformen und die ROS-Produktion	20
1.5	Fragestellung	21
2	MATERIAL	22
2.1	Bezugsquellennachweis	22
2.1.1	Chemikalien	22
2.1.2	Stimulantien und Hemmstoffe	22
2.1.3	Radiochemikalien	22
2.1.4	Zellkulturmedien / Transfektion	23
2.1.5	„Kits“ und Sonstiges	23
2.1.6	Bakterienstämme, Plasmide, Baculoviren	23
2.1.6.1	Bakterienstämme	23
2.1.6.2	Plasmide	24
2.1.6.3	Rekombinante Baculoviren	24
2.1.7	Zelllinien	25
2.1.8	Antikörper	25
2.1.8.1	Primäre Antikörper	25
2.2.8.2	Sekundäre Antikörper	26
2.2	Stammlösungen und häufig verwendete Puffer	26

3.	METHODEN	28
3.1	Molekularbiologische Methoden	28
3.1.1	DNA-Transfer in E. coli Bakterien	28
3.1.1.1	Medien für E. coli Kulturen	28
3.1.1.2	Herstellung kompetenter E.coli Bakterien	29
3.1.1.3	Transformation von kompetenten E. coli Bakterien	29
3.1.1.4	Schüttel-und Dauerkulturen von E. coli Bakterien	30
3.1.1.5	Erzeugung rekombinanter Bacmide	30
3.2	Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen	30
3.2.1	Kultivierung von Zelllinien	30
3.2.2	Transfektion	31
3.2.2.1	Kalziumphosphat-Methode (HEK 293-Zellen)	31
3.2.2.2	Elektroporation (RBL2H3-Zellen)	31
3.2.2.3	Transfektion mit rekombinanten Bacmiden	31
3.2.2.4	Infektion von SF-9-Zellen	32
3.2.3	Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien	32
3.2.4	Isolierung neutrophiler Granulozyten aus humanem Vollblut	32
3.3	Proteinanalytische Methoden	33
3.3.1	Lyse von Zellen	33
3.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	34
3.3.3	Immunopräzipitation von Proteinen	34
3.3.4	Reinigung Epitop-markierter Proteine	35
3.3.4.1	Tandem Affinity Purification	35
3.3.4.2	Flag-His-Reinigung	36
3.3.4.3	GST-Reinigung	36
3.3.4.4	His-Reinigung	37
3.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.3.6	Blue-Native-Gelelektrophorese (BN-PAGE)	37
3.3.7	Färbung und Entfärbung von PAA-Gelen	38
3.3.7.1	Comassiefärbung	38
3.3.7.2	Silberfärbung	39
3.3.8	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran	39
3.3.9	Immunodetektion von Proteinen	39
3.3.10	Massenspektrometrie	40
3.3.10.1	In-Gel-Fragmentierung von Proteinen und Elution der Peptide	40
3.3.10.2	Massenspektrometrische Analyse	40
3.3.11	Zellfraktionierung zur Gewinnung von Zytosol und Zellmembranen	40
3.3.12	Bestimmung der O ₂ ⁻ -Produktion in neutrophilen Granulozyten	41
3.3.13	In vitro-Kinase-Assay	41
3.3.14	Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	Etablierung der Tandem Affinity Purification für PI3K γ und sein Adapterprotein p101 in Säugerzellen	43
4.1.1	Klonierung der Hybridgene	43
4.1.2	Synthese der Fusionsproteine in Säugerzellen	44
4.1.3	Synthese der Fusionsproteine in stabilen Zelllinien	45
4.1.4	Induzierbare Expression von TAP-PI3K γ	46
4.1.5	Reinigung TAP-Epitop-markierter Fusionsproteine	47
4.2	Isolierung PI3K γ -assoziierter Komplexe mittels Immunopräzipitation	49
4.2.1	PKC-Isoformen als Interaktionspartner von PI3K γ	52
4.2.2	Untersuchung zur Komplexbildung von PI3K γ und PKC α	53

4.2.3	PI3K γ -PKC α -Interaktion in neutrophilen Granulozyten	55
4.3	Charakterisierung der PI3K γ -PKC α -Interaktion	56
4.3.1	Untersuchung der PI3K γ -PKC α -Interaktion in vitro	56
4.3.2	Protein-Protein-Interaktionsstudien in SF-9-Zellen	57
4.3.3	Untersuchungen zur Transphosphorylierung zwischen PI3K γ und PKC α	60
4.3.4	Wechselseitiger Einfluss auf die Protein- bzw. Lipidkinaseaktivität	61
4.4	Untersuchungen zur funktionellen Relevanz der PI3K γ -PKC α -Interaktion in neutrophilen Granulozyten	63
4.4.1	PI3K γ -PKC α -Interaktion nach fMLP-Stimulation	64
4.4.2	Aktivierung von PI3K γ und PKC α nach fMLP-Stimulation	65
4.4.3	PI3K γ -PKC α -Interaktion nach TPA Stimulation	65
4.4.4	PI3K γ -PKC α -Interaktion nach IL-8-Stimulation	66
4.4.5	ROS-Produktion	67
4.4.6	Effekt der PI3K γ -Inhibition auf die PI3K γ -PKC α -Wechselwirkung	69
4.4.7	Zytosolische Komponenten der NADPH-Oxidase als Bindungspartner von PI3K γ	70
4.4.8	Zweite Phase der PI3K γ -PKC α -p47 ^{phox} -Komplexbildung	73
4.4.9	Interaktion zwischen PI3K γ und weiteren PKC-Isoformen	74
5.	DISKUSSION	76
5.1	Tandem Affinity Purification von PI3K γ und p101	76
5.1.1	Etablierung stabiler Zelllinien zu Synthese TAP-Epitop-markierter Fusionsproteine	77
5.1.2	Reinigung von TAP-Epitop-markiertem PI3K γ und p101	78
5.2	Identifizierung von PI3K γ -Interaktionspartnern	79
5.3	Komplexbildung von PI3K γ und PKC α	81
5.4	Charakterisierung der PI3K γ -PKC α -Interaktion	82
5.4.1	Protein-Protein-Interaktionsstudien	82
5.4.2	Transphosphorylierung zwischen PI3K γ und PKC α	84
5.4.3	Wechselseitige Beeinflussung der Kinasaktivität	85
5.5	Untersuchungen zur physiologischen Relevanz der PI3K γ -PKC α -Interaktion in neutrophilen Granulozyten	85
5.5.1	Effekt der fMLP-Stimulation auf die Wechselwirkung	86
5.5.2	Einfluss der PKC α -Aktivierung auf die Interaktion mit PI3K γ	87
5.5.3	Zelluläre Reaktionen die zum Anstieg der Komplexbildung zwischen PI3K γ und PKC α führen	88
5.5.4	Auswirkung der PI3K γ -Inhibition auf die PI3K γ -PKC α -Interaktion	89
5.5.5	Zytosolische Komponenten der NADPH-Oxidase als Bindungspartner von PI3K γ	91
5.5.6	Modell der PI3K γ abhängigen Regulierung der ROS-Produktion	93
5.5.7	Zweite Phase der PI3K γ -PKC α -p47 ^{phox} -Komplexbildung nach fMLP-Stimulation	94
5.5.8	Interaktion von PI3K γ mit weiteren PKC-Isoformen	95
5.6	Ausblick	97
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	LITERATURVERZEICHNIS	100
Anhang		

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS252424	(5-[5-(4-fluoro-2-hydroxy-phenyl)-furan-2-ylmethylene]-thiazolidine-2,4 -dione)
BIM	Bisindolylmaleimid
BN	Blue Native
BSA	Rinderserumalbumin
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FBS	Fötales Rinderserum (fetal bovine serum)
fMLP	N-formyl Met-Leu-Phe
G418	Geneticin
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GST	Glutathione S-Transferase
KIDO	Kinasedomäne
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HL-60	human promyelocytic (Zelllinie)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IP ₃	Inositoltriphosphate
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
MBP	Myelin Basic Protein
NP-40	NONIDET P-40

O ₂ •	Superoxidanion
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PKC-1	Phosphoinositid-abhängige Kinase
PH	Pleckstrin Homologie
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI(4)P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBD	Ras-Bindedomäne
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAP	Tandem Affinity Purification
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TPA	Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
WM	Wortmannin
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

Die Kommunikation zwischen Zellen ist eine essentielle biologische Funktion in multizellulären Organismen. Während der Evolution haben sich Mechanismen der Zell-Zell-Kommunikation entwickelt, die eine Organ-, Gewebe- oder Zelltyp-spezifische Anpassung erfahren haben. Externe Signale können durch spezifische Rezeptoren der Zielzellen wahrgenommen und ins Innere der Zelle übertragen werden. Diese Signale lösen Protein-Protein-Interaktionen, Protein-Phosphorylierungen bzw. die Bildung von sekundären Botenstoffen (second messenger) aus und führen schließlich zu spezifischen zellulären Reaktionen. Bei der Signalweiterleitung nehmen multifunktionelle Signalproteine, zu denen auch Phosphoinositid-3-Kinasen gehören, eine Schlüsselposition ein.

1.1 Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)

PI3K sind eine Familie evolutionär konservierter Enzyme, die die Phosphorylierung der 3'-OH-Position des Inositolringes ihrer Substrate katalysieren. Sie agieren als wichtige Signalproteine fundamentaler, zellulärer Regulationsprozesse. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass PI3K als Regulatoren von Zellteilung (Alvarez et al., 2003), Wachstum (Leevers et al., 1996; Weinkove et al., 1999), Apoptose (Khwaja et al., 1997; Kulik et al., 1997; Scheid et al., 1995; Yao and Cooper, 1995), Glucose-Metabolismus (Cantley, 2002), oxidativem Stress (Barthel and Klotz, 2005) oder auch Umordnungsprozessen des Zytoskeletts (Servant et al., 2000; Wang et al., 2002) eine wichtige Rolle spielen.

Basierend auf ihrer Struktur, Substratspezifität und Regulation werden PI3Ks in vier Klassen eingeteilt: Klasse IA, IB, II und III (Abb. 1.1). Homologe Regionen (HR) dienen der Bindung der Lipidsubstrate, Phosphatidylinositolgruppen und von ATP. HR1 ist die Kinasedomäne, HR2 eine helikale Domäne und HR3 ist eine C2-Domäne. HR1, 2 und 3 kommen in allen katalytischen Untereinheiten der PI3Ks vor, bei der Klasse II gibt es eine zusätzliche C-terminale C2-Domäne. Eine Ras-Bindedomäne (HR4) enthalten nur PI3Ks der Klasse I und II.

Mitglieder der Klasse II phosphorylieren Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylinositol-4-Phosphat PI(4)P in vitro (Arcaro et al., 1998; Domin and Waterfield, 1997) während für Klasse III PI3Ks nur PI als Substrat in vitro dient. Beide Klassen sind noch wenig untersucht und sollen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter beschrieben werden.

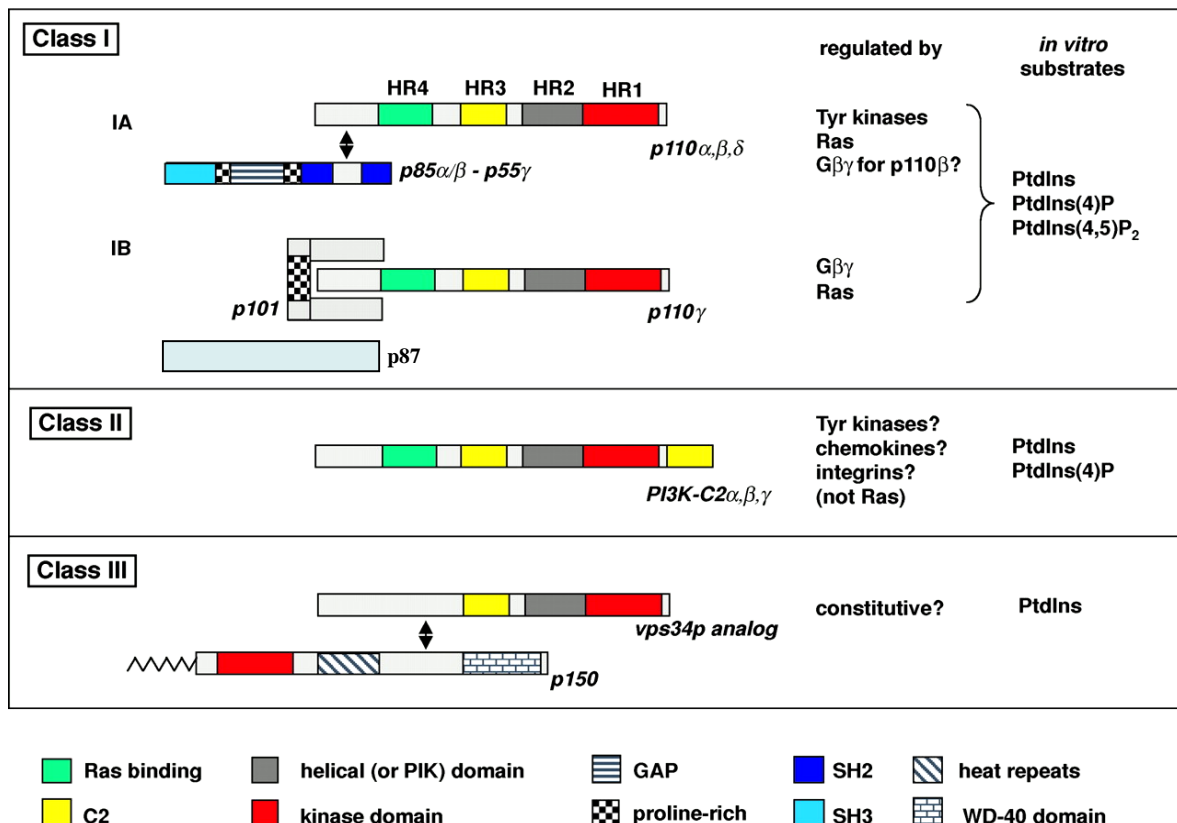


Abb. 1.1: Die Domänenstruktur der PI3Ks und ihrer Adapterproteine
Dargestellt sind die Vertreter der verschiedenen Klassen der PI3Ks mit den entsprechenden Adapterproteinen (modifiziert nach Vanhaesebroeck et al., 2001)

1.1.1 Die Klasse I der Phosphoinositid-3-Kinasen

PI3K der Klasse I phosphorylieren *in vitro* PI, PI(4)P und PI(4,5)P₂, wobei *in vivo* eine gewisse Selektivität für PI(4,5)P₂ gezeigt werden konnte (Hawkins et al., 1992). Klasse I PI3Ks treten überwiegend als heterodimere Komplexe mit Adapterproteinen auf, die bestimmte Signale auf die katalytische Untereinheit übertragen können. Eine weitere Gemeinsamkeit aller Mitglieder dieser Familie ist die homologe Region HR4, die auch als Ras-Bindedomäne (RBD) bezeichnet wird. Zwar wurde sie auch in PI3Ks der Klasse II identifiziert, doch eine funktionelle Bedeutung wurde bisher nur in PI3Ks der Klasse I nachgewiesen (Foster et al., 2003). Die Aufgabe der RBD besteht in der Membrantranslokation der PI3Ks, die durch die Interaktion mit Ras erreicht wird, welches durch seine Lipidanker fest mit der Membran assoziiert ist. Die Bindung von Ras kann zusätzlich zur Verstärkung der Lipidkinaseaktivität führen (Pacold et al., 2000; Suire et al., 2002).

Zusätzlich zu ihrer Lipidkinaseaktivität verfügen PI3K der Klasse I über eine Proteinkinaseaktivität (Arcaro et al., 1998; Carpenter et al., 1993; Dhand et al., 1994; Stoyanova et al., 1997; Vanhaesebroeck et al., 1997). Die PI3K der Klasse I werden weiter in zwei Unterklassen unterteilt, Klasse IA und Klasse IB.

1.1.1.1 Klasse IA der Phosphoinositid-3-Kinasen

Innerhalb der Klasse IA der PI3Ks unterscheidet man in Säugetieren drei Isoformen: PI3K α , PI3K β und PI3K δ . Die jeweilige katalytische Untereinheit weist ein Molekulargewicht um 110 kDa auf und wird demzufolge auch p110 genannt. Klasse IA PI3K sind mit Adapteruntereinheiten von 50-85 kDa (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ , p50 α) (Abb. 1.1) assoziiert. Die regulatorischen Untereinheiten p50 α , p55 α sowie p85 α gehen durch differentielles Spleissen aus einem Gen hervor. p85 β und p55 γ werden von anderen Genen kodiert. Die verschiedenen Adapteruntereinheiten zeigen keine Selektivität in ihrer Bindung an die katalytische Untereinheit. Da sie aber eine gewebespezifische Verteilung aufweisen, könnten die strukturellen Unterschiede von regulatorischer Bedeutung sein (Domin and Waterfield, 1997).

Während PI3K α und PI3K β offenbar in allen Geweben exprimiert werden, konnte eine Synthese von PI3K δ nur in Leukozyten und humanen Thrombozyten nachgewiesen werden (Vanhaesebroeck et al., 1997b). Die Existenz verschiedener Isoformen, der katalytischen als auch der regulatorischen Untereinheit, ermöglicht einen weit reichenden Spielraum für Gewebespezifität, Kopplung an unterschiedliche Rezeptoren und die daraus resultierende Ansteuerung verschiedener Signalwege.

Die Aktivierung der Klasse IA PI3K wird zum größten Teil über die regulatorischen Untereinheiten vermittelt. Diese enthalten zwei SH2-Domänen (Src homology 2 domains), eine Inter-SH2-Region, welche für die Bindung an PI3K verantwortlich ist, und mindestens eine prolinreiche Region. Über die SH2-Domänen werden phosphorylierte Tyrosinreste aktivierter Rezeptortyrosinkinasen erkannt. Agonisten, die zur Aktivierung von Klasse IA PI3Ks führen, sind beispielsweise EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) und Insulin (Vanhaesebroeck et al., 2001). Für PI3K β wird eine alternative Aktivierung durch die Bindung von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten an die katalytische Untereinheit diskutiert. (G $\beta\gamma$ -Untereinheiten werden nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) aus heterotrimeren G-Proteinen freigesetzt.) Das Signal wird somit direkt und unabhängig von der regulatorischen Untereinheit vermittelt (Kurosu et al., 1997; Maier et al., 1999). Auf den entsprechenden Stimulus hin erfolgt die Translokation der PI3K zur Plasmamembran. Dort kommt es zur Phosphorylierung der Lipidsubstrate, die als second messenger fungieren und somit eingegangene Signale weiterleiten.

Zusätzlich zur Lipidkinaseaktivität konnte für Klasse IA PI3K auch eine Serin/Threonin-Proteinkinaseaktivität nachgewiesen werden (Carpenter et al. 1993; Hunter, 1995). Es wurde gezeigt, dass es in vitro zur Transphosphorylierung der Adapterproteine durch PI3K α und PI3K β (Dhand et al., 1994; Foukas et al., 2004) und zur Autophosphorylierung von PI3K β und PI3K δ

kommt (Vanhaesebroeck et al., 1997; Czupalla et al., 2003). PI3K α und PI3K β phosphorylieren p85 α am Serin 608 innerhalb der Inter-SH2-Domäne. Das führt zur deutlichen Herabregulation der Lipidkinaseaktivität und zu verringerter Bindung des Enzyms an das Adapterprotein (Foukas et al., 2004). Im Gegensatz dazu phosphoryliert PI3K δ seine Adapteruntereinheit nicht. Aber PI3K δ kann sich in vivo am Serin 1039 im C-Terminus autophosphorylieren. Auch das führt zur deutlichen Herabregulation der Lipidkinaseaktivität (Vanhaesebroeck et al., 1999). Eine inhibitorische Autophosphorylierung im C-Terminus (Serin 1070) konnte auch für PI3K β in vitro nachgewiesen werden (Czupalla et al., 2003).

Lange Zeit war IRS-1 (Insulin-Rezeptor-Substrat-1) das einzig bekannte exogene Protein, welches von PI3K der Klasse IA, speziell PI3K α , phosphoryliert wird (Lam et al., 1994). Rondinone et al. konnten später auch PDE3B als Substrat der Proteinkinaseaktivität von PI3K in Adipozyten identifizieren (Rondinone et al., 2000). Kürzlich wurden auch das translation initiation factor 4E binding protein (4EBP) und H-Ras als Substrate der Proteinkinaseaktivität von PI3K α und PI3K γ in vitro nachgewiesen (Foukas and Shepherd, 2004).

1.1.1.2 Klasse IB der Phosphoinositid-3-Kinasen

Das einzige Mitglied der Klasse IB ist PI3K γ , deren katalytische Untereinheit erstmals von Stoyanov et al. kloniert wurde (Stoyanov et al. 1995). Die katalytische Untereinheit ist strukturell gleich zu katalytischen Untereinheiten der Klasse IA, besitzt aber keine Bindedomäne für p85-Untereinheiten. PI3K γ wird nicht über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sondern durch Interaktion mit G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert. G $\beta\gamma$ -Untereinheiten werden nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) aus heterotrimeren G-Proteinen freigesetzt (Stoyanov et al., 1995)

Adapterproteine von PI3K γ

Die regulatorische Untereinheit p101 unterscheidet sich stark von den Adapterproteinen der Klasse IA und weist ein Molekulargewicht von 101 kDa auf und bindet über größere Bereiche im N- aber auch C-Terminus an die N-terminale Domäne von PI3K γ (Krugmann et al., 1999). Die genaue Funktion von p101 wurde bisher in der Literatur kontrovers diskutiert. Stephens et al. zeigen, dass p101 G $\beta\gamma$ -Untereinheiten effizienter bindet als PI3K γ und essentiell für die G $\beta\gamma$ -Stimulation von PI3K γ ist (Stephens et al., 1997). Kürzlich konnten Voigt et al. nachweisen, dass innerhalb von p101 die C-terminale Domäne für die Bindung von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten verantwortlich ist (Voigt et al. 2005). Andere Arbeiten deuten darauf hin, dass p101 nicht für die Aktivierung von PI3K γ durch G $\beta\gamma$ -Proteine benötigt wird und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten direkt an PI3K γ binden können (Stoyanov et al., 1995; Tang and Downes, 1997; Leopoldt et al., 1998).

Daten von Brock et al. weisen darauf hin, dass in vivo die Bindung von p101 an G $\beta\gamma$ -Untereinheiten der Membranrekrutierung von PI3K γ dient und die darauf folgende Wechselwirkung zwischen PI3K γ und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten die Lipidkinaseaktivität des membrangebundenen Enzyms unabhängig von p101 verstärkt (Brock et al., 2003). Es gibt auch Hinweise darauf, dass das Adapterprotein p101 erforderlich ist, um die Lipidsubstratspezifität von PI3K γ festzulegen. Dabei wird die katalytische Untereinheit gegenüber G $\beta\gamma$ sensibilisiert, falls PI(4,5)P₂ als Substrat vorhanden ist (Maier et al., 1999).

Kürzlich wurde von zwei Arbeitsgruppen parallel ein weiteres Adapterprotein für p110 γ identifiziert, was von einem separaten Gen kodiert ist. Suire et al. nennen dieses Protein p84, während Voigt et al. die Bezeichnung p87^{PIKAP} nutzen. p84 bzw. p87^{PIKAP} zeigt C- und N-terminal Homologien zu p101 (Suire et al., 2005; Voigt et al., 2006). Wie auch p101 bindet es PI3K γ sowie G $\beta\gamma$ -Untereinheiten und trägt zur Aktivierung von PI3K γ bei. Nachdem anfangs davon ausgegangen wurde, dass dieses Adapterprotein in Zellen, die kein p101 synthetisieren, die Rolle der regulatorischen Untereinheit übernimmt, wurde mittlerweile eine Co-Expression in dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen. In Kardiomyozyten zeigt p84 bzw. p87^{PIKAP} im Vergleich zu p101 eine sehr hohe Expression und ist darüber hinaus in der Lage mit PDE3B zu interagieren (Voigt et al., 2006).

Organ- und Zelltyp-spezifische Expression von PI3K γ

Die ersten Hinweise auf die Existenz einer G-Protein-abhängigen PI3K wurden in neutrophilen Granulozyten entdeckt (Hawkins et al., 1992; Stephens et al., 1993). Kurze Zeit später wurde PI3K γ erstmals aus Leukozyten-DNA kloniert (Stoyanov et al., 1995). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass das Enzym auch in Zellen nicht hämatopoetischen Ursprungs synthetisiert wird. PI3K γ wurde in Geweben wie Prostata, Nieren, Speicheldrüsen und dem exokrinen Pankreas (Bernstein et al., 1998) entdeckt. In Endothelzellen (Arcaro et al., 1998), Kardiomyozyten (Bony et al., 2001), erythroide Vorläuferzellen (Schmidt et al., 2004) und den Langerhansschen Inseln des Pankreas (MacDonald et al., 2004) wurde PI3K γ ebenfalls nachgewiesen. Geringe Mengen PI3K γ konnten auch in Neuronen identifiziert werden (König et al., mündliche Mitteilung; Narita et al., 2004). Noch ist die Funktion von PI3K γ in diesen Zelltypen nicht vollständig geklärt. In Endothelzellen wird PI3K γ eine regulatorische Rolle bei der Produktion reaktiver Sauerstoffradikale und der Wechselwirkung mit neutrophilen Granulozyten zugewiesen (Puri et al., 2005). In Kardiomyozyten wurde PI3K γ als negativer Regulator der Herzkontraktionsfähigkeit identifiziert (Crackower et al., 2002). Patrucco et al. zeigten eine stimulatorische Wechselwirkung von PI3K γ auf die Phosphodiesterase 3B (PDE3B), die zur Verringerung des cAMP Spiegels führt (Patrucco et al.,

2004). Kürzlich konnte zudem nachgewiesen werden, dass PI3K γ über diese Interaktion zu PDE3B auch regulatorischen Einfluss auf L-Typ-Kalzium-Kanäle nimmt (Marcantoni et al., 2006).

Die Proteinkinaseaktivität von PI3K γ

Wie alle PI3K der Klasse I ist auch PI3K γ ein dualspezifisches Enzym und weist zusätzlich zur Lipidkinaseaktivität eine Proteinkinaseaktivität auf, die sich in der Phosphorylierung von Serinresten widerspiegelt.

Stoyanova et al. konnten in vitro die Autophosphorylierung von PI3K γ nachweisen (Stoyanova et al., 1997). Die Phosphorylierung findet am C-terminal lokalisierten Serin 1101 statt und hat im Gegensatz zur Autophosphorylierung von PI3K β und PI3K δ keine inhibitorische Auswirkung auf die Lipidkinaseaktivität des Enzyms (Czupalla et al., 2003). Die physiologische Bedeutung dieser Autophosphorylierung nicht geklärt.

Des weiteren konnte in vitro die Transphosphorylierung des Adapterproteins p101 und MEK-1 (mitogen activated protein kinase kinase 1/ERK activator kinase 1), einem Protein welches in den ERK-MAPK-Signalweg eingebunden ist, gezeigt werden (Bondev et al., 1999). Nachdem Lopez-Illasaca et al. zeigten, dass PI3K γ in die G-Protein-abhängige Aktivierung der ERK eingebunden ist (Lopez-Illasaca et al., 1997), wurden weitere Untersuchungen mit einer Lipidkinase-negativen PI3K γ -Mutante durchgeführt, die belegten die Aktivierung der ERK unabhängig von der PI(3,4)P₂- und PI(3,4,5)P₃-Akkumulation war (Bondeva et al., 1998). Das heißt, die Lipidkinaseaktivität von PI3K γ kann für Aktivierung des MAPK-Signalweges ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Hinweis für die Proteinkinaseaktivität von PI3K γ konnte vor kurzem von Naga Prasad et al. erbracht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung von nicht muskulärem Tropomyosin durch PI3K γ unabdingbar für die Agonist-induzierte Internalisierung β -adrenerger Rezeptoren (β AR) ist (Naga Prasad et al., 2005). Gleichzeitig interagiert PI3K γ mit der β -adrenergen Rezeptor-Kinase (β ARK). Diese Bindung wird über die helikale Domäne von PI3K γ vermittelt und ist unabhängig von deren Enzymaktivität. Für einen funktionellen Endozytosekomplex ist zudem die Bildung von PI(3,4,5)P₃ essentiell (Naga Prasad et al., 2005). Diese Daten weisen auf die multifunktionelle Wirkungsweise von PI3K γ bei der Regulation einzelner Signalwege hin. Die oben angeführte Wechselwirkung zwischen PI3K γ und PDE3B scheint zwar indirekt über dritte Bindungspartner vermittelt zu werden, sie ist jedoch ebenfalls von der PI3K γ -Kinaseaktivität unabhängig (Patrucco et al., 2004).

1.2 3-Phosphoinositide als second messenger und 3-Phosphoinositid-bindende Domänen

Trotz der Multifunktionalität von PI3K ist die Lipidkinaseaktivität, die charakteristische und am besten untersuchte Funktion dieser Enzyme. In Folge der Aktivierung von PI3Ks kommt es innerhalb der Zelle zur transienten Akkumulation von der Lipidprodukte PI(3)P, PI(3,4)P₂ und PI(3,4,5)P₃. Diese Lipide agieren als so genannte second messenger und dienen damit der Weiterleitung PI3K-abhängiger Signale. Eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine ist in der Lage, diese Phospholipide zu erkennen. Die Erkennung wird durch verschiedene Phosphoinositid-Bindedomänen vermittelt und führt zur Rekrutierung nachgeschalteter Effektorproteine an die Membran.

1.2.1 Die FYVE-Domäne

Die FYVE-Domäne (benannt nach den Namen der ersten vier Proteine, in denen sie entdeckt wurde: Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1) ist eine Cystein-reiche, Zn²⁺-bindende Domäne über ca. 200 Aminosäuren. Sie bindet ausschließlich PI(3)P. Bis heute wurde sie in mehr als 60 Proteinen nachgewiesen, die meist in die Regulation des Vesikeltransports oder auch des TGFβ-Rezeptor-Signalweges eingebunden sind (Itoh and Takenawa, 2002; Wurmser et al., 1999).

1.2.2 Die PX-Domäne

Die PX-Domäne (Phox-Domäne) ist die jüngste nachgewiesene Phosphoinositid-Bindedomäne. Sie umfasst ca. 120 Aminosäuren und wurde in über 100 Proteinen identifiziert, die hauptsächlich an Prozessen wie Vesikeltransport, Proteinsortierung oder Lipidmodifikation beteiligt sind. Proteine des Phagozyten-NADPH-Oxidase-Komplexes (PHOX) p40^{phox} und p47^{phox}, aber auch Nexine, Phospholipase D1 /D2 (PLD1/2) und CPK-PI3K (Klasse II PI3K) weisen eine PX-Domänen auf. Während die meisten PX-Domänen wie FYVE-Domänen nur PI(3)P binden, interagieren die PX-Domänen von p47^{phox} und CPK-PI3K, einer PI3K der Klasse II, bevorzugt mit PI(3,4)P₂ bzw. PI(4,5)P₂ (Kanai et al., 2001; Song et al., 2001).

1.2.3 Die ENTH-Domäne

Die ENTH-Domäne (Epsin N_H2-terminal homology Domäne) ist eine PI(3,4,5)P₃-bindende Domäne, im N-Terminus von Proteinen, welche in Verbindung mit Endozytose oder auch Aktinregulation stehen (De Camilli et al., 2002).

1.2.4 Die PH-Domäne

Die am weitesten verbreitete Bindedomäne für 3-Phosphoinositide ist die PH-Domäne (Pleckstrin-Homologie-Domäne). Diese globuläre Domäne aus ca. 120 Aminosäureresten, die zuerst im Phosphoprotein Pleckstrin identifiziert wurde, bindet sowohl PI(3,4)P₂ als auch P(3,4,5)P₃. Es wurde auch beschrieben, dass Gβγ-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine an PH-Domänen binden können (Touhara et al., 1994). Bis jetzt wurde die Domäne in weit mehr als 100 Proteinen unterschiedlichster Funktionen nachgewiesen (Vanhaesebroeck et al., 2001). Zu den Effektorproteinen zählen u. a. Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren für Rac. Damit können PI3K Einfluss auf die Migration von Zellen nehmen. Ferner werden PI3K mit der Aktivierung von Tec (tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma)-Kinasen, eine Familie von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, in Zusammenhang gebracht (Wymann and Pirola, 1998). Zu dieser Familie zählt auch Bruton Tyrosin Kinase (Btk), die mit hoher Affinität über die PH-Domäne PI(3,4,5)P₃ bindet. Zwar wird die Phospholipase Cγ (PLCγ) durch Btk aktiviert, doch konnte außerdem gezeigt werden, dass die PH-Domäne (Falasca et al., 1998) bzw. die SH2-Domäne (Bae et al., 1998a) der PLCγ selbst selektiv an PI(3,4,5)P₃ binden können. Auch die Phosphoinositid-regulierte Kinase 1 (PDK1) und Akt besitzen eine PH-Domäne, welche mit hoher Affinität PI(3,4,5)P₃ binden.

1.2.5 Akt als Effektor der PI3K-Lipidkinaseaktivität

Akt gehört zu den nachgeordneten Effektormolekülen der PI3K. Sie ist eine 53 kDa große Serin/Threonin-Proteinkinase und kann als Homologon zum viralen Oncogen v-Akt angesehen werden. Sie wird auch Protein-Kinase-B (PKB) genannt. Durch die Bindung an P(3,4,5)P₃ erfolgt die Translokalisierung zur Plasmamembran, eine Konformationsänderung und die damit verbundene Phosphorylierung durch PDK-1. Zur vollständigen Aktivierung und die Rückkehr ins Zytosol ist eine zweite Phosphorylierung nötig. Die dafür verantwortliche Kinase ist allerdings noch nicht identifiziert (Dong and Liu, 2005). Eine Autophosphorylierung des Proteins wird diskutiert (Toker and Newton, 2000).

Im Zytosol oder Zellkern kann Akt verschiedene Proteine phosphorylieren. Das geht oft mit der Inhibition der Signalwege einher, in die die Effektorproteine eingebunden sind. So kommt es durch

die Aktivität von Akt zu anti-apoptotischen, metabolischen und proliferativen Effekten in der Zelle (Abb. 2). Beispielsweise wird mTOR (mammalian target of rapamycin) durch die inhibitorische Phosphorylierung von TSC (tuberous sclerosis complex), einem GTPase aktivierenden Protein von Rheb (Ras homologue enriched in brain), indirekt aktiviert. mTOR phosphoryliert und aktiviert p70S6-Kinase und inhibiert 4EBP, was beides zu einer Erhöhung der Translation führt (Bader et al., 2005; Hay, 2005). Die Akt-abhängige Phosphorylierung von MDM2 führt zur Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 und ist damit anti-apoptotisch (Mayo and Donner, 2002). Auch die GSK-3 β -Phosphorylierung wirkt hemmend auf das Protein, welches für die Degradation von Regulatoren des Zellzyklus verantwortlich ist.

Die Caspase-9, eine Protease, die an der Initiation der Apoptose beteiligt ist, ließ sich ebenfalls als Substrat für eine inhibitorische Phosphorylierung durch Akt nachweisen (Vanhaesebroeck et al., 2001). Darüber hinaus ist Akt auch an der Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor κ B) beteiligt, einem Transkriptionsfaktor, welcher die Expression anti-apoptotischer Gene fördert. NF- κ B liegt im Zytoplasma in einem inaktiven Komplex mit I κ B (inhibitor of NF- κ B) vor. Akt aktiviert die I κ B-Kinasen, welche wiederum den Faktor I κ B phosphorylieren und damit dessen Abbau bewirken. Der somit freie Transkriptionsfaktor NF κ B kann in den Zellkern wandern und dort die Transkription bestimmter Gene aktivieren (Khwaja, 1999).

1.2.6 Regulation der PI3K-Lipidkinaseaktivität

Die PI3K-aktivierten Signalwege müssen innerhalb der Zelle kontrolliert werden. Zum Beispiel weisen erste Daten von Kang et al. darauf hin, dass Klasse 1 PI3K kanzerogenes Potential besitzen, was im Fall von PI3K β , - γ und - δ durch die Wildtypformen auch ohne jegliche aktivitätssteigernde Mutation möglich ist (Kang et al., 2006).

Die Regulation der Signalwege, die über die Lipidkinaseaktivität der PI3K vermittelt werden, erfolgt durch Lipid-Phosphatasen. Durch die gezielte Abspaltung von Phosphatgruppen agieren diese Phosphatasen als Antagonisten von PI3K. Damit wird die Signalwirkung der Phosphoinositide aufgehoben (Abb. 1.2). Zu diesen Proteinen gehören PTEN (Protein Tyrosine Phosphatase and Tensin Homolog) und SHIP (SH2-containing Inositol-5-Phosphatase). PTEN, ein 54-kDa-Protein, wurde ursprünglich als Tumorsuppressorprotein entdeckt und zunächst als eine Tyrosinphosphatase betrachtet (Li et al., 1997). Später stellte sich heraus, dass PTEN die 3-Phosphatgruppe aller Phosphoinositide dephosphoryliert (Maehama and Dixon, 1998). Der Verlust des Proteins in Tumoren führt zur Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges (Hay, 2005).

Die Familie der SHIP-Proteine setzen PI(3,4,5)P₃ in PI(3,4)P₂ um. Dazu gehören SHIP1 (145 kDa; in Zellen hämatopoetischen Ursprungs), sSHIP (104 kDa; in Stammzellen) und SHIP2 (150 kDa; weit

verbreitet in verschiedenen Zelltypen) (Sly et al., 2003). Mit ihren SH2-Domänen können SHIP-Proteine an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder Adapterproteine binden. Tyrosin-Phosphorylierungen von SHIP führen zur Assoziation mit p85 (Gupta et al., 1999). Dadurch wird eine Rekrutierung von SHIP zum Ort der $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ -Produktion ermöglicht.

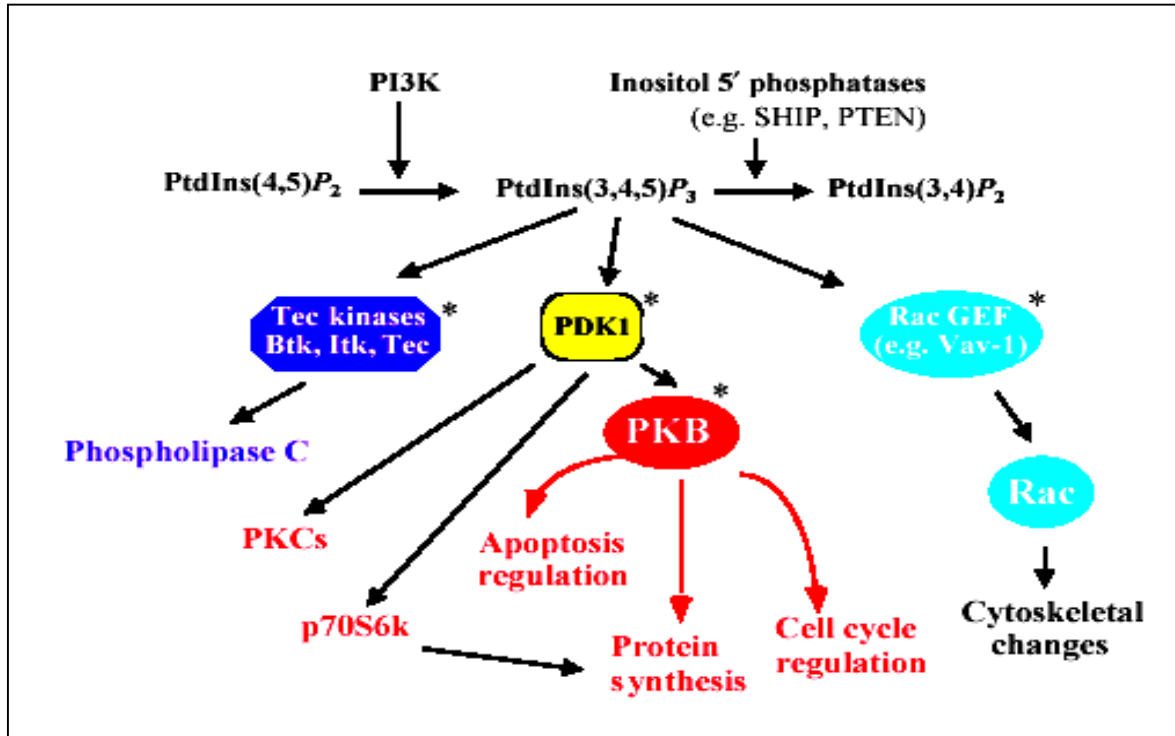


Abb. 1.2: Überblick über die Hauptsignalwege, die durch $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ reguliert werden. Proteine, die mit einem Stern gekennzeichnet sind, besitzen PH-Domänen, welche direkt an $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ binden (nach Cantrell, 2001).

1.3 Funktionen von $\text{PI3K}\gamma$ im Immunsystem

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl verschiedener Funktionen von $\text{PI3K}\gamma$ im Immunsystem identifiziert (Koyasu, 2003; Vanhaesebroeck et al., 2005; Hirsch et al., 2006). Studien mit $\text{PI3K}\gamma^{-/-}$ -Mäusen, die nahezu zeitgleich von drei verschiedenen Gruppen beschrieben wurden, trugen dabei wesentlich zur Aufklärung bei (Hirsch et al., 2000; Li et al., 2000; Sasaki et al., 2000).

1.3.1 Funktionen von $\text{PI3K}\gamma$ im adaptiven Immunsystem

Viele PI3K -abhängige Funktionen in B- und T-Zellen gehen auf Mitglieder der Klasse IA PI3K zurück. Sie werden beispielsweise über T- und B-Zell-Rezeptoren, stimulatorische Rezeptoren von natürlichen Killerzellen aber auch über IgG- bzw. IgE-Rezeptoren aktiviert (Koyasu, 2003). B-Zellen von $\text{PI3K}\gamma^{-/-}$ -Mäusen weisen keinerlei morphologische oder funktionelle Änderungen im Gegensatz zu Wildtypzellen auf (Vanhaesebroeck et al., 2005). Für $\text{PI3K}\gamma$ wird aber eine wichtige

Rolle in der T-Zell-Entwicklung diskutiert. PI3K γ ^{-/-}-Mäuse besitzen einen verkleinerten Thymus und eine verringerte Anzahl von T-Zellen (Sasaki et al., 2002). In Thymozyten leitet PI3K γ Signale verschiedener GPCRs weiter, die antiapoptotisch wirken oder auch die Differenzierung in CD4⁺/8⁺-T-Helferzellen kontrollieren (Rodriguez-Borlado et al., 2003). Die pharmakologische Inhibition von PI3K γ in Jurkat-Zellen, resultierte in einer verringerten IL-2-Produktion der Zellen (Kitanovic et al., unveröffentlichte Daten). Für die vollständige Reifung von T-Zellen wird eine Rolle für PI3K γ und auch PI3K δ diskutiert. Es wird angenommen, dass beide Isoformen kompensatorisch wirken (Webb et al., 2005). Die Rolle von PI3K γ bei der Migration von T-Zellen wird kontrovers diskutiert. (Ward, 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass PI3K γ die SDF-1-induzierte Migration von T-Zellen reguliert (Curnock et al., 2002; Reif et al., 2004). Andere Studien deuten darauf hin, dass T-Zellen für die Migration PI3K γ -unabhängige Signalwege nutzen (Nombela-Arrieta et al., 2004).

1.3.2 Funktionen von PI3K γ in Mastzellen

Stimulierte Mastzellen setzen Vesikel frei, die vasoaktive und proinflammatorische Stoffe wie Histamin enthalten und tragen dadurch zur Abwehr von Parasiten und infektiösen Substanzen bei. Allergien, Asthma und die Entwicklung eines anaphylaktischen Schocks können auf unkontrollierte Aktivierung von Mastzellen zurückgeführt werden. PI3K γ ^{-/-}-Mäuse sind gegen die Ausbildung eines anaphylaktischen Schocks geschützt (Laffargue et al., 2002). Zusammen mit PI3K δ kontrolliert PI3K γ die Degranulation von Mastzellen über zwei aufeinander folgende Phasen. Während der ersten Phase kommt es über die Stimulation von Fc ϵ R1-Rezeptoren zur Aktivierung von PI3K δ (Ali et al., 2004). Es wird angenommen, dass daraufhin die Sekretion spezifischer Substanzen wie Adenosin bewirkt wird und es somit zur autokrinen Stimulation von GPCRs kommt. Dies bewirkt eine zweite, massive, PI3K γ -gesteuerte Degranulationsphase (Laffargue et al., 2002; Wymann et al., 2003). Gleichzeitig führt die Aktivierung von PI3K γ zur Migration von Mastzellen (Kitaura et al., 2005a).

1.3.3 Funktionen von PI3K γ in neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Sie zirkulieren in großen Mengen im Blutstrom. In Folge eines chemotaktischen Stimulus verlassen sie das vaskuläre System und dringen in das betroffene Gewebe ein. Dort kommt es zur Phagozytose und zur Vernichtung von Mikroorganismen. Zu den chemotaktischen Substanzen zählen unter anderem Chemokine, fMLP (N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), Leukotriene B₄, IL8 und C5a. fMLP beispielsweise ist ein bakterieller Metabolit, der von spezifischen GPCRs erkannt wird,

die auf Monozyten oder neutrophilen Granulozyten lokalisiert sind (Ye und Boulay, 1997). Andere Chemotaxine werden an den Orten der Infektion durch Gewebezellen, anwesende und rekrutierte Leukozyten und durch Zytokin-aktivierte Endothelzellen sekretiert. Es bildet sich ein chemotaktischer Konzentrationsgradient, der den Entzündungsstimulus umgibt und zusätzlich an der Oberfläche des darüberliegenden Endotheliums vorhanden ist. Die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten ist im Organismus gut koordiniert und ausbalanciert. So ist bei minimaler Schädigung des körpereigenen Gewebes eine maximale Bekämpfung invasiver Erreger gewährleistet. PI3K γ spielt eine regulatorische Rolle zellulärer Reaktionen von neutrophilen Granulozyten.

1.3.3.1 PI3K γ und Chemotaxis

Um den Entzündungsherd zu erreichen, wandern neutrophile Granulozyten in einem Integrin-vermittelten Prozess entlang des Endotheliums in Richtung des chemotaktischen Gradienten. Es konnte demonstriert werden, dass PI3K-abhängige Signalwege die Affinität von $\beta 3$ -Integrinen zu ihren Liganden erhöht. Dadurch wird die Migrationsgeschwindigkeit reduziert und somit die Signalaufnahme am Endothel verbessert (Bruyninckx et al., 2001).

Viele der chemotaktischen Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten sind GPCRs und aktivieren PI3K γ . In neutrophilen Granulozyten von Mäusen geht der Hauptanteil der fMLP-induzierten PI(3,4,5)P₃-Akkumulation auf PI3K γ zurück (Li et al., 2000). Es wurde eine lokale Häufung von PI(3,4,5)P₃ am leading edge (dem vorderen Zellpol bei der Bewegung in eine bestimmte Richtung) migrierender neutrophiler Granulozyten beobachtet (Rickert et al., 2000).

Experimente mit neutrophilen Granulozyten aus PI3K $\gamma^{-/-}$ -Mäusen haben gezeigt, dass diese im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten aus Wildtypmäusen eine stark verringerte Migration in Richtung chemotaktischer Reize wie fMLP (Hannigan et al., 2002; Li et al., 2000), IL8 (Hirsch et al., 2000), MIP-1 α (Li et al., 2000) und C5a (Hirsch et al., 2000) aufweisen. PI3K $\gamma^{-/-}$ -Zellen zeigen zwar eine normale Motilität, d.h. fMLP-induzierte Adhäsionsprozesse und Bildung von F-Actin finden statt (Hirsch et al., 2000; Li et al., 2000; Sasaki et al., 2000). Sie sind aber nicht in der Lage, einen leading edge aufrecht zu erhalten und somit gezielt in eine Richtung zu migrieren (Hannigan et al., 2002). Es wird angenommen, dass lokal konzentriertes PI(3,4,5)P₃ zur Rekrutierung von Effektorproteinen mit PH-Domänen (z. Bsp. Akt oder GEFs für Rac) führt und dies wiederum zur gerichteten Verteilung und Aktivierung der Zellbewegungsmaschinerie führt. PI3K γ -Aktivität agiert somit als Kompass für die Bewegungskoordination neutrophiler Granulozyten in Richtung des chemotaktischen Stimulus.

Ein eindrucksvoller Beleg für das therapeutische Potential dieser PI3K γ -Funktion bei der Bekämpfung inflammatorischer Erkrankungen wurde in der Studie von Camps et al., 2005

erbracht. Die Gruppe hat herausgefunden, dass PI3K γ ^{-/-}-Mäuse gegen eine artifiziell induzierte Form der Arthritis geschützt sind. Dieser Schutz korreliert mit der defekten Migration neutrophiler Granulozyten und kann in Wildtyp-Mäusen, die mit spezifischen PI3K γ -Inhibitoren behandelt werden, reproduziert werden. Demzufolge kann PI3K γ bei chronischen Entzündungsreaktionen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis, ein Erfolg versprechendes Ziel therapeutischer Behandlungen darstellen (Camps et al., 2005).

Ein erster Hinweis auf eine inhibitorische Rückkopplung von PI3K γ in Bezug auf die Migration stammt aus einer Studie von Fan und Malik. Die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit MIP-2, einem Chemokin von Makrophagen, bewirkt neben einer PI3K γ -abhängigen die Migration der Zellen auch die erhöhte Expression von GPCR-Kinasen (GRKs). GRKs wiederum induzieren die Internalisierung und Desensitivierung des MIP-2-Rezeptors (Fan and Malik, 2003).

1.3.3.2 PI3K γ und die ROS-Produktion

Die Fähigkeit zur Produktion toxischer Sauerstoffradikale (ROS) ist ein wichtiger Bestandteil der Abwehr von Mikroorganismen durch neutrophile Granulozyten. Die Sauerstoffradikale werden durch einen Multienzymkomplex, die NADPH-Oxidase gebildet. Der Oxidasekomplex besteht aus zytosolischen und membranständigen Proteinen, die in ruhenden neutrophilen Granulozyten nicht assoziiert vorliegen. Auf den entsprechenden Stimulus hin wandern die zytosolischen Komponenten p40^{phox}, p47^{phox}, p60^{phox} und Rac2 zur Plasmamembran und formen mit Flavozytochrom b₅₅₈ und Rap1A die funktionstüchtige Oxidase (Babior et al., 2002). Flavozytochrom b₅₅₈ besteht aus den Untereinheiten gp91 und p22 und agiert als ein Elektronentransporter zur Bildung von Sauerstoffradikalen aus Sauerstoff und NADPH. Die Stimulation von neutrophilen Granulozyten durch fMLP, C5a oder auch Phorbol ester führt zur Hyperphosphorylierung von p47^{phox}, das daraufhin als Adapterprotein für die Zusammenführung von zytosolischen und membranständigen Oxidasekomponenten fungiert (Abb. 1.3). In vitro konnte eine Phosphorylierung von p47^{phox} durch PKCs (Fontayne et al., 2002) und Akt (Chen et al., 2003; Hoyal et al., 2003) nachgewiesen werden. (Die PKC-abhängige Phosphorylierung von p47^{phox} ist in Abschnitt 1.4.6.2 näher beschrieben) Des Weiteren wird diskutiert, dass ERK und p38 in die p47^{phox}-Phosphorylierung involviert sind (El Benna et al., 1996; Dewas et al., 2002).

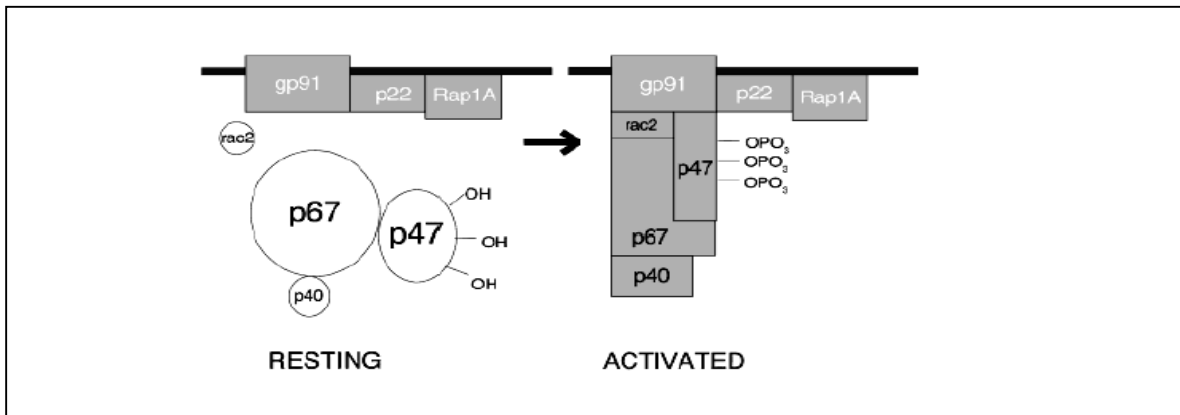


Abb. 1.3: Aktivierung der NADPH-Oxidase

In nicht aktivierten Zellen sind die Oxidasekomponenten im Zytosol verteilt (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} und Rac2) oder membranständig (Rap1A, Cytochrom b₅₅₈, p22^{phox}, gp91^{phox}). Werden die Zellen aktiviert, findet eine mehrfache Phosphorylierung von p47^{phox} statt. Daraufhin werden die zytosolischen Komponenten an die Membran rekrutiert und binden dort an Cytochrom b₅₅₈ zur Bildung der aktiven Oxidase (nach Babior, 1999).

Einer der markantesten Phänotypen von PI3K γ ^{-/-}-Mäusen ist der komplette Verlust der fMLP-induzierten ROS-Produktion. Die Inhibition von PI3K γ blockiert die fMLP- oder C5a-induzierte ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten, während der TPA-induzierte Effekt nicht beeinflusst wird (Ding et al., 1995). Condliffe et al. konnten zeigen, dass PI3K γ in TNF α -vorbehandelten humanen und auch neutrophilen Granulozyten von Mäusen essentiell für die Initiation einer bisphasischen ROS-Produktion nach fMLP-Stimulierung ist (Condliffe et al., 2005). Es wird angenommen, dass PI3K γ für die Organisation und Aktivierung der NADPH-Oxidase mit verantwortlich ist. Im Detail ist der Mechanismus der Steuerung der ROS-Produktion durch PI3Ks noch nicht aufgeklärt. Die meisten bisherigen Daten deuten darauf hin, dass PI3Ks über die Lipidkinaseaktivität Einfluss auf die ROS-Bildung nehmen. Mehrfach wurde nachgewiesen, dass Akt zur Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit p47^{phox} beiträgt. Yamamori et al. konnten diese Daten nicht bestätigen, diskutieren aber eine PI(3,4,5)P₃-abhängige Aktivierung von PLC γ 2. Diese kann wiederum zur Aktivierung von DAG-abhängigen PKCs und somit zur Phosphorylierung von p47^{phox} führen (Yamamori et al., 2004). Welch et al. diskutieren die PIP₃-abhängige Regulierung von Rac, während Babior auf die Aktivierung von atypischen PKCs durch PIP₃ verweist (Babior, 1999; Welch et al., 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass p47^{phox} und p40^{phox} auch 3-Phosphoinositide binden und so die Lokalisation und Aktivierung der Oxidase durch PI3Ks reguliert wird (Ellson et al., 2001; Kanai et al., 2001). Außerdem wird diskutiert, dass es nach fMLP-Stimulation zu einer PI3K-abhängigen Aktivierung von ERK kommt (Chen et al., 2005; Rane et al., 1997), das wiederum in der Lage ist, p47^{phox} zu phosphorylieren (El Benna et al., 1996; Dewas et al., 2002).

Die atypische PKC ι , deren Mausortholog als λ bezeichnet wird, und PKC ζ enthalten eine C1-Domäne aber keine C2-Domäne. Eine N-terminale PB1-Domäne (Phox und Bem1) ist für Protein-Protein-Interaktionen zuständig (Hirano et al., 2004). aPKCs werden weder durch DAG noch durch Ca²⁺-Ionen reguliert, sondern durch Interaktionen mit anderen Proteinen, die ebenfalls eine PB1-Domäne enthalten, und durch Lipide unbekannter Identität.

1.4.1 Die C1-Domäne der PKCs

Die cysteinreiche C1-Domäne besteht aus ca. 50 Aminosäuren und konnte als der Teil von PKC identifiziert werden, der die Bindung von Phorbolestern und DAG vermittelt (Nishizuka, 1988). C1-Domänen sind hochkonserviert und wurden neben PKCs auch in weiteren Proteinen, wie PKD, Ras-GRP, DAG-Kinasen oder Raf nachgewiesen (Kazanietz, 2002; Ron and Kazanietz, 1999). Die Funktion der C1-Domäne kann innerhalb einzelner Proteine abweichen. So binden beispielsweise die C1-Domänen von DAG-Kinasen und Raf keine Phorbolster bzw. DAG, sondern sind an Protein-Protein- oder Lipid-Protein-Wechselwirkungen beteiligt.

1.4.2 Die C2-Domäne der PKCs

Die C2-Domäne umfasst ca. 130 Aminosäuren und wurde ursprünglich als Ca²⁺-Bindestelle in cPKCs identifiziert (Bazzi and Nelsestuen, 1990). Später wurden weitere Proteine entdeckt, die zwar eine C2-Domäne enthalten, jedoch auch an Ca²⁺-unabhängigen Protein-Lipid-Interaktionen oder an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Ponting and Parker, 1996). Viele dieser Proteine spielen eine Rolle bei Membrantransportprozessen (Synaptotagmin, Rabphilin 3-A, Unc-13) oder auch Signaltransduktionsprozessen, wie im Falle der PKCs, Phospholipasen oder PI3K.

Die Ca²⁺-Bindung an die C2-Domäne hat zwei Funktionen. Einerseits wird eine Konformationsänderung des Proteins induziert, was zur Verstärkung der Protein-Membran-Interaktion führt, andererseits gehen anionische und zwitterionische Lipide sowohl mit Aminosäureresten der C2-Domäne als auch mit Ca²⁺-Ionen Wechselwirkungen ein. PKC α beispielsweise komplexiert zwei Ca²⁺-Ionen, von denen eines für Konformationsänderungen, das andere für die Bindung von Phosphatidylserin (PS) zuständig ist (Medkova and Cho, 1999). Aminosäurereste in den Ca²⁺-bindenden Schleifen, die nicht an der Komplexierung von Ca²⁺-Ionen beteiligt sind, sind entscheidend für die Lipidselektivität. Kationische Reste finden sich in PS-bindenden C2-Domänen, aliphatische und aromatische in PC-bindenden C2-Domänen. Die C2-Domänen von nPKCs agieren Ca²⁺-unabhängig. Dafür hat die C2-Domäne von PKC ϵ eine hohe Affinität zu Phosphatidsäure, einem Produkt von Phospholipase D (Garcia-Garcia et al., 2001).

1.4.3 Die katalytische Domäne der PKCs

Zwar ist bis heute die dreidimensionale Struktur der katalytischen Domäne von PKCs noch nicht bekannt, doch stimmt die Primärsequenz zu ca. 40 % mit der katalytischen Domäne der PKA überein. Die größten Unterschiede zeigen sich im C-terminalen Bereich (Ron et al., 1999). Die katalytische Domäne wird in eine C3-Domäne (ATP-bindende Region) und eine C4-Domäne (Substrat-bindende Region) unterteilt. Letztere wird in der geschlossenen, inaktiven Konformation durch das N-terminale Pseudosubstrat besetzt (Orr and Newton, 1994). Ein essenzielles Strukturelement aller Proteinkinasen ist der so genannte activation loop mit der konservierten DFG-Sequenz, die für die ATP-Bindung notwendig ist (Kannan and Neuwald, 2005). Eine Phosphorylierung im activation loop ist notwendig, um das katalytische Zentrum in eine aktive Konformation zu bringen (Parker and Parkinson, 2001).

Wichtig für die Substratspezifität und zelluläre Lokalisierung der PKC-Isoformen sind zwei C-terminale Autophosphorylierungsstellen im turn motif bzw. im hydrophobic motif (Newton, 2003).

1.4.4 Reifung und Aktivierung von cPKCs

Nach der Translation durchlaufen cPKCs mehrere spezifische Phosphorylierungen, um eine aktivierbare Konformation zu erlangen (Abb. 1.5). Neu synthetisierte cPKCs interagieren mit Hilfe ihrer C1- und C2-Domänen sowie des basischen Pseudopeptids mit anionischen Lipiden der Zellmembran. Dieser Vorgang bringt das Protein in eine offene Konformation, in der das Pseudosubstrat aufgrund der Membraninteraktion nicht die Substratbindestelle besetzt und der C-Terminus mit PDK-1 interagieren kann. Offenbar erfolgt durch PDK-1 die erste Phosphorylierung der PKC im activation loop (Dutil et al., 1998). Im Falle von PKC α wird der Aminosäurerest T497 phosphoryliert (Parekh et al., 2000). Während die PDK-1-Phosphorylierung von Akt PI(3,4,5)P₃ abhängig ist (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000), wird das Lipid bei der cPKC-Phosphorylierung nicht benötigt (Newton, 2003). Auch die Phosphorylierung der nPKCs und aPKCs durch PDK-1 ist teilweise abhängig von PI(3,4,5)P₃ (Le Good et al., 1998).

Nach der initialen Phosphorylierung kommt es zur Autophosphorylierung im turn motif sowie im hydrophobic motif. Die dreifach phosphorylierte PKC verlässt die Membran und geht im Zytosol in eine geschlossene Konformation über. Die N-terminale Pseudosubstratregion besetzt dabei die Substratbindestelle und inhibiert die Kinaseaktivität. Die cPKC ist nun in der Lage Ca²⁺-Ionen und DAG zu binden, was zur Freisetzung des Pseudosubstrats aus der Substratbindestelle und zum Erreichen einer offenen, enzymatisch aktiven Konformation führt (Newton, 2003). Nach

Stimulation mit Phorbolestern kann es zu mindestens zwei weiteren Autophosphorylierungen kommen. So phosphoryliert PKC α beispielsweise sein Threonin 250 und Serin 260 (Ng et al., 1999).

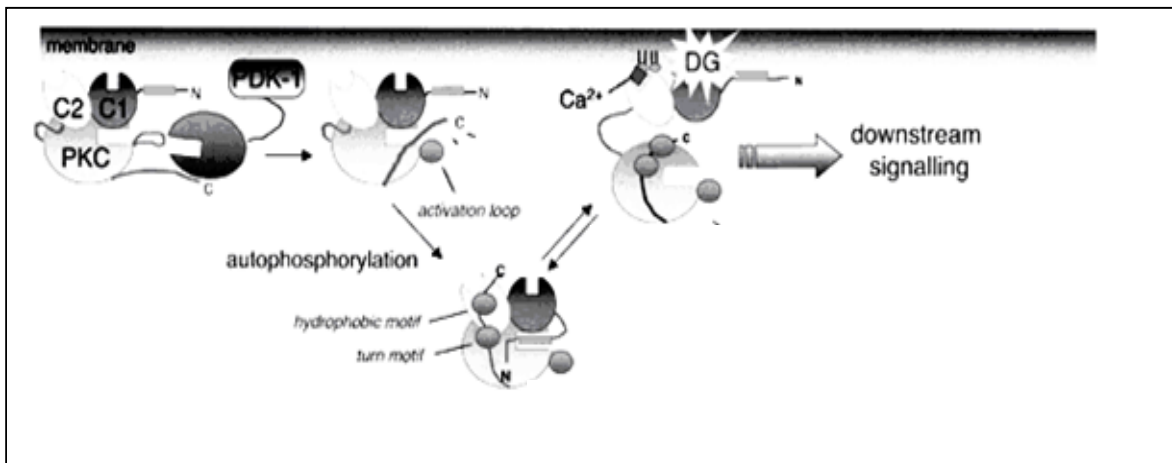


Abb. 1.5: Die Reifung und Aktivierung von cPKC

Neu synthetisierte PKC wird offenbar durch PDK-1 im activation loop phosphoryliert. Darauf folgen zwei Autophosphorylierungen, die das Protein in eine aktivierbare Konformation bringen. Infolge der Aktivierung durch DAG und Ca²⁺-Ionen wird das Pseudosubstrat von der Substratbindestelle verdrängt und die PKC kann Substratproteine phosphorylieren. Nach andauernder Aktivierung wird die PKC an den C-terminalen Autophosphorylierungsstellen von Proteinphosphatasen dephosphoryliert und damit inaktiviert. (nach Newton, 2003)

1.4.5 PKC-interagierende Proteine

PKCs interagieren mit einer großen Anzahl verschiedener Proteine, was zur Regulierung und Koordination der PKC-Funktionen in der Zelle beiträgt. Die Bindungspartner, die nicht als direktes Substrat fungieren, beeinflussen u.a. die Lokalisation, Stabilität oder Aktivität der PKC-Isoformen.

Es gibt Proteine, die PKCs in räumliche Nähe zu vorgeschalteten Aktivatoren bringen. So wird beispielsweise Syndecan-4 als Bindungspartner von PKC α eine Rolle bei dessen subzellulärer Lokalisierung und Bindung an Phospholipide zugeschrieben (Oh et al., 1998).

Andere Bindeproteine, die als RACKs (receptors for activated C-kinase) bezeichnet werden, binden neben Phospholipiden auch selektiv PKC-Isoformen. RACKs verankern aktivierte PKC in distinkten Membranregionen, bringen sie in räumliche Nähe zu Substraten und stabilisieren die aktive Konformation von PKC (Jaken and Parker, 2000; Mochly-Rosen and Gordon, 1998).

Auch STICKs (substrates that interact with C-kinase) sind für die gezielte Erkennung von Substraten verantwortlich, wobei sie im Unterschied zu RACKs auch Substrate für PKCs darstellen (Chapline et al., 1998). STICKs sind Phospholipid-bindende Proteine, die an Kontaktstellen zwischen Membran und Zytoskelett lokalisiert sind. Membranphospholipide (z. B. Phosphatidylserin) interagieren sowohl mit STICKs als auch mit PKCs und bewirken deren Co-Lokalisation. Es kommt zur Bindung zwischen der regulatorischen Domäne von PKC und einem Bereich von

STICK, der in der Nähe eines PKC-Substrat-Motivs liegt. Die Phosphorylierung von STICKs durch PKCs verändert deren Funktion indem die Interaktion mit Phospholipiden, PKCs und anderen Proteinen wie Calmodulin oder Actin verringert wird. Auf diese Weise können PKCs Prozesse steuern, die mit Veränderungen der Membran- und Zytoskelettstruktur (Adhäsion, Motilität und Sekretion) einhergehen (Jaken and Parker, 2000; Mineo et al., 1998).

Weiterhin wurden Wechselwirkungen zwischen PKCs und AKAPs (A kinase anchoring protein) nachgewiesen. AKAPs, deren primäres Merkmal die Interaktion mit regulatorischen Untereinheiten von PKA ist, agieren auch als Scaffold-Proteine, die in der Lage sind, Proteine aus mehreren Signalwegen zu binden und deren Aktivität zu koordinieren. Speziell für GPCRs bilden AKAPs eine Organisationseinheit, welche die Assoziation von spezifischen Kinasen und Phosphatasen bewirkt und somit zur Signalweiterleitung von GPCRs innerhalb der Zelle beitragen (Malbon et al., 2004). Eine Interaktion mit PKC wurde für AKAP79, AKAP350, AKAP-Lbc, Gravin/AKAP250 und Pericentrin nachgewiesen (Übersicht in Wong and Scott, 2004).

1.4.6 Funktionen von PKCs

PKCs sind an bedeutenden zellulären Prozessen, wie Proliferation, Apoptose (Musashi et al., 2000), Migration (Larsson, 2006), Sekretion (Marinari et al., 2003), Transkriptionskontrolle (Ventura and Maioli, 2001), Embryonalentwicklung (Gallicano et al., 1997) und weiteren Vorgängen beteiligt. Verschiedene Isoformen können unterschiedliche, sogar gegensätzliche Einflüsse auf einen Signalweg haben. So haben PKC α , β , ϵ , ζ und ι eine antiapoptotische Wirkung, während eine Aktivierung von PKC δ Apoptose induzieren kann (Dempsey et al., 2000).

1.4.6.1 Funktionen von PKCs in neutrophilen Granulozyten

Der Einfluss von PKC-Isoformen auf biologische Funktionen neutrophiler Granulozyten ist noch weitgehend unverstanden. Neutrophile Granulozyten exprimieren die klassischen Isoformen PKC α , PKC β 1, PKC β 2, die atypische Isoform PKC ζ und die neuartige PKC δ (Selvatici et al., 2006). Asehnoune et al. konnten zeigen, dass PKC α und PKC β in die TLR2 (toll like receptor) und TLR4 abhängige Aktivierung von NF- κ B eingebunden sind (Asehnoune et al., 2005).

Die Rolle von PKC-Isoformen bei der Migration neutrophiler Granulozyten wird kontrovers diskutiert. Nach Stimulation neutrophiler Granulozyten mit einem fMLP-Analog, welches ausschließlich die Migration stimuliert, konnten Spisani et al. lediglich eine Aktivierung von PKC β 1 nachweisen (Spisani et al., 2005). Arbeiten von Laudanna et al. und Chodniewicz/ Zhelev dagegen weisen auf eine Einbindung von PKC ζ bei der Migration hin (Chodniewicz and Zhelev, 2003; Laudanna et al., 1998).

1.4.6.2 PKC-Isoformen und die ROS-Produktion

Der Einfluss verschiedener PKC-Isoformen auf die ROS-Produktion wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In vitro phosphorylieren PKC α , PKC β II, PKC ζ und PKC δ p47^{phox}, eine Komponente der NADPH-Oxidase. Dabei werden von PKC ζ fünf Serinreste als Substrat genutzt, von den anderen PKCs acht Serinreste. Da die Phosphorylierung durch PKC ζ im Vergleich zur stärksten Aktivierung der NADPH-Oxidase führte, wird vermutet, dass sich die Phosphorylierung einiger Serinreste durch PKC α , PKC β II, und PKC δ inhibitorisch auf die p47^{phox}-Aktivität auswirken könnte (Fontayne et al., 2002).

Neutrophile Granulozyten von PKC $\beta^{-/-}$ -Mäusen zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine um 50 % geringere ROS-Produktion (Dekker et al., 2000). Während Dang et al. durch Inhibition von PKC ζ in neutrophilen Granulozyten und HL-60 Zellen eine Reduktion der p47^{phox}-Translokation und O₂^{•-}-Produktion nachweisen konnten, finden Yamamori et al. keine Aktivierung von PKC ζ in Folge der fMLP-Stimulation von HL-60-Zellen (Dang et al., 2001; Yamamori et al., 2004). In Endothelzellen ist PKC ζ in die Aktivierung der NADPH-Oxidase involviert und interagiert dabei mit PI3K γ (Frey et al., 2006). In HL-60-Zellen trägt PKC δ zwar zur ROS-Produktion bei, scheint aber hier nicht an der Translokation von p47^{phox} beteiligt zu sein (Waki et al., 2006). Für PKC α wurde in vivo die Beteiligung an der O₂^{•-}-Produktion in Monozyten demonstriert (Li et al., 1999).

1.5 Fragestellung

PI3K γ ist ein multifunktionelles Signalprotein mit einem breiten Funktionsspektrum. Die meisten der bis heute identifizierten Funktionen beziehen sich auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Insbesondere in Zelltypen des angeborenen Immunsystems ist PI3K γ ein Regulator zellulärer Reaktionen, die der initialen Abwehr invasiver Erreger dienen. Diese Funktionen machen PI3K γ auch zu einem potenziellen Angriffspunkt bei der Behandlung inflammatorischer Erkrankungen. Die molekularen Mechanismen der PI3K γ -abhängigen Signalweiterleitung sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Hat man bisher viele Funktionen von PI3K γ ausschließlich seiner Lipidkinaseaktivität zugeschrieben, so weisen neue Daten auf eine weit größere Komplexität der Signaltransduktion hin. Jüngste Studien in Kardiomyozyten lassen vermuten, dass die Proteinkinaseaktivität und kinaseunabhängige Protein-Protein-Interaktionen bei der Vermittlung von PI3K γ -Signalen eine entscheidende Rolle spielen. In Zellen des Immunsystems ist bisher sehr wenig über PI3K γ -Protein-Bindungspartner und Substrate der PI3K γ -Protein-Kinaseaktivität bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, neue, bis dato unbekannte Interaktionspartner von PI3K γ in Zellen des Immunsystems zu identifizieren und potentielle Wechselwirkungen funktionell zu charakterisieren. Dadurch sollte zu einem detaillierteren Verständnis der multifunktionellen Eigenschaften von PI3K γ beigetragen werden.

2 Material

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

AEBSF	AppliChem
Aprotinin	Bayer
Geneticin	Invitrogen
Lucigenin	Sigma
NP-40	ICN Biomedicals
Pepstatin A	Calbiochem
TEMED	Serva

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von der Firma Roth oder Sigma bezogen.

2.1.2 Stimulantien und Hemmstoffe

BIM I	Sigma
fMLP	Sigma
AS252424	Serono
TPA	Alexis Biochemicals
Wortmannin	Alexis Biochemicals
IL-8	R&D Systems

2.1.3 Radiochemikalien

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ >5000 Ci/mmol

Alle Radiochemikalien wurden von der Hartmann Analytik GmbH bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

2.1.4 Zellkulturmedien / Transfektion

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 50% (v/v) /	
HAMS F12-Medium 50% (v/v)	PAA Laboratories
RPMI 1640	PAA Laboratories
SF-900 II	Gibco
FBS	Biochrom
HBSS	Gibco
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories
Lipofectamine®	Gibco
Cellfectin®	Invitrogen

2.1.5 „Kits“ und Sonstiges

CL-XPosure Filme	Pierce
ECL Kit	Perkin Elmer Life Science
FLAG – Peptid	Sigma
GammaBind-G-Sepharose	Amersham Bioscience
Glutathion-Sepharose	Amersham Bioscience
Histone TypIII-SS calf thymus	Sigma
Maus-IgG2a	Sigma
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Polypropylensäule	Qiagen

2.1.6 Bakterienstämme, Plasmide, Baculoviren

2.1.6.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
TG1	K12, hsdD5/F traD36 proA ⁺ B ⁺ Δ(lac-pro) lacI ^q lacZΔM15 sup E thi	(Carter et al., 1985)
DH10Bac™	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7696 galU galK λ- rpsL nupG / bMON14272 / pMON7124	Invitrogen

Tab. 2.1: Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten E. coli- Stämme

2.1.6.2 Plasmide

Bezeichnung	Merkmale	Herkunft
pUC119	Ap ^r	(Vieira and Messing, 1987)
pUC119-PI3K γ	kodiert PI3K γ ; Ap ^r	diese Arbeit
pBS1479	kodiert C-TAP (CBP-ProtA); Ap ^r	(Puig et al., 2001)
pBS1761	kodiert N-TAP (ProtA-CBP); Ap ^r	(Puig et al., 2001)
pcDNA3-C-TAP	kodiert C-TAP; Ap ^r , Tc ^r	Institut f. molekul. Zellbiologie, Jena
pMT/Flag-His	kodiert Flag-His; Ap ^r	T. Tenev
pUC19-N-TAP	kodiert die TAP-Epitope	diese Arbeit
pcDNA3-C-TAP-PI3K γ *	kodiert PI3K γ -TAP; Ap ^r	diese Arbeit
pcDNA3-N-TAP-PI3K γ **	kodiert N-TAP-PI3K γ ; Ap ^r	diese Arbeit
pcDNA3-C-Flag-His-PI3K γ **	kodiert C-Flag/His-PI3K γ ; Ap ^r	diese Arbeit
pNRTIS21	Ap ^r , Neo ^r , TC reprimierbarer Promotor	Institut f. molekul. Zellbiologie, Jena
pNRTIS-N-TAP-PI3K γ **	Ap ^r , Neo ^r , TC reprimierbarer Promotor	diese Arbeit
pCMV-EE-p101	kodiert EE- p101	(Krugmann et al., 1999)
pCMV-N-TAP-p101 **	kodiert N-TAP-p101	diese Arbeit
pFastBac TM 1	Ap ^r	Invitrogen,
pDEST27-GST-N-term-PI3K γ	kodiert für GST-PI3K γ ; Ap ^r	Institut f. molekul. Zellbiologie, Jena
pcDNA3-PKC α ***	kodiert für PKC α ; Ap ^r	(Adomeit et al., 1999)
pUC119-PKC α ***	kodiert für PKC α ; Ap ^r	diese Arbeit
pUC19-GST	kodiert für GST; Ap ^r	diese Arbeit
pFastBac1-PKC α ***	kodiert für PKC α ; Ap ^r ; Gm ^r	diese Arbeit
pFastBac1-GST	kodiert für GST; Ap ^r ; Gm ^r	diese Arbeit
pFastBac1-GST-PKC α ***	kodiert für GST-PKC α ; Ap ^r ; Gm ^r	diese Arbeit

Tab. 2.2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

* Klonierungsvektoren

** die Plasmide wurden zur Transfektion von Säugerzellen eingesetzt.

*** die jeweiligen Plasmide wurden für PKC α_{wt} , kinaseinaktive PKC α_{in} (K368 à R) und konstitutiv aktive PKC α_{con} (A25 à E) erzeugt

2.1.6.3 Rekombinante Baculoviren

Protein	Mutation	Herkunft
His-PI3K γ_{wt}	-	Institut f. molekul. Zellbiologie, Jena
His-PI3K $\gamma_{\Delta KIDO}$	$\Delta 776-1102$	Institut f. molekul. Zellbiologie, Jena
His-PI3K $\gamma_{\Delta RBD}$	$\Delta 220-311$	Institut f. molekul. Zellbiologie, Jena
GST-PI3K γ_{KR}	K833R	Institut f. molekul. Zellbiologie, Jena
p85 α	-	Institut f. molekul. Zellbiologie, Jena
p110 β	-	Institut f. molekul. Zellbiologie, Jena
GST-PKC α	-	diese Arbeit
GST-PKC α_{in}	A25E	diese Arbeit
GST-PKC α_{con}	K368R	diese Arbeit

Tab. 2.3: Verwendete Baculoviren zur Produktion rekombinanter Proteine in SF-9-Insektenzellen mit dem Bac-to-Bac[®] Baculovirus-Expressionsvektorsystem (Invitrogen)

2.1.7 Zelllinien

SF-9:	Spodoptera frugiperda (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ No. ACC 125)
HEK293:	human embryonal kidney (DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
RBL2H3:	rat basophilic leukemia (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primäre Antikörper

AK	Typ	Bezeichnung/Antigen	Bezugsquelle	Verdünnung	Einsatz
GST	Kaninchen, polyklonal	Glutathion-S-Transferase aus Schistosoma japonicum	Santa Cruz Biotech. Inc.	1:500	WB
p101-11	Kaninchen, polyklonal	humanes p101, Peptide: RDPGHFLILLEQILQKTREC	Institut für molekul. Zellbiologie, Jena	1:200	WB
p47 ^{phox}	Kaninchen, polyklonal	Sc-14015	Santa Cruz Biotech. Inc.	1:1000	WB
p67 ^{phox}	Maus, monoklonal	610912	BD Biosciences	1:500	WB
PI3K γ -641	Maus, monoklonal		Institut für molekul. Zellbiologie, Jena		IP
PI3K γ -B4	Maus, monoklonal	humane PI3K γ , AS 94-334	Institut für molekul. Zellbiologie, Jena	1:100	WB
PKC α	Maus, monoklonal	610108	BD Biosciences		IP
PKC α	Kaninchen, polyklonal	Sc-208	Santa Cruz Biotech. Inc.	1:2000	WB
PKC β I	Kaninchen, polyklonal	Sc-209	Santa Cruz Biotech. Inc.	1:2000	WB
PKC β II	Kaninchen, polyklonal	Sc-210	Santa Cruz Biotech. Inc.	1:2000	WB
PKC δ	Kaninchen, polyklonal	Sc-213	Santa Cruz Biotech. Inc.	1:2000	WB
PKC ζ	Kaninchen, polyklonal	Sc-216	Santa Cruz Biotech. Inc.	1:2000	WB
PLC γ 1	Maus, monoklonal	Sc-7290	Santa Cruz Biotech. Inc.	1:1000	WB
p-Serin	Kaninchen, polyklonal	61-8100	Zymed Laboratories	2 μ g/ml	WB
Rac2	Kaninchen, polyklonal	AS 1-192 humanes Rac2	Upstate	1:500	WB
SHIP2	Ziege polyklonal	Sc-14502	Santa Cruz Biotech. Inc.	1:500	WB

Tab. 2.4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper

2.2.8.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Typ	Kopplung	Bezugsquelle	Verdünnung
Maus-IgG	Ziege polyklonal	HRP	Kirkegaard & Perry Laborat. Gaithersburg	1:10000
Kaninchen-IgG	Ziege polyklonal	HRP	Kirkegaard & Perry Laborat. Gaithersburg	1:10000
Ziege-IgG	Esel polyklonal	HRP	Santa Cruz Biotech. Inc.	1:10000

Tab. 2.5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper

2.2 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

BBS (BBS-buffered saline):	BES	50 mM		
	NaCl	280 mM		
	Na ₂ HPO ₄ pH 6,96	1,5 mM		
TE-Puffer:	Tris-HCl pH 7,5	10 mM		
	EDTA	1 mM		
TBE-Puffer: (0,5-fach)	Tris-HCl pH 8,0	45 mM		
	Borsäure	45 mM		
	EDTA	1,5 mM		
DNA-Auftragepuffer:	Glycerin	50 % (v/v)		
	Bromphenolblau	0,05 % (v/v)		
	EDTA	100 mM		
Proben-Puffer : (2-fach)	Tris-HCl pH 6,0	100 mM		
	SDS	4 % (v/v)		
	β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)		
	Glycerin	20 % (v/v)		
	Bromphenolblau	0,1 % (v/v)		
	DTT	200 mM		
Sammelgel (5%):	Acrylamid/Bisacrylamid(29:1)	0,8 ml		
	4-fach Laufgelpuffer	1,2 ml		
	a. dest.	2,8 ml		
Trenngel:		7,5 %	10 %	12,5 %
	Acrylamid/Bisacrylamid(29:1)	3,6 ml	4,8 ml	6,0 ml
	4-fach Laufpuffer	3,6 ml	3,6 ml	3,6 ml
	a. dest.	7,2 ml	6,0 ml	4,8 ml
Protein-Elektrophoresepuffer: (10-fach)	Tris-HCl pH 8,3	250 mM		
	Glycin	2,5 M		
	SDS	1 % (v/v)		

Färbelösung für Proteingele:	Coomassie	0,5 % (v/v)
	Ethanol	45 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	a. dest.	45 % (v/v)
Entfärbelösung für Proteingele:	Essigsäure	7,5 % (v/v)
	Methanol	5 % (v/v)
	a. dest.	87,5 % (v/v)
Transfer-Puffer:	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
NET-G-Puffer:	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Tween 20	0,05 % (v/v)
	Gelatine	0,05 % (v/v)

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit angewandte molekularbiologische Standardmethoden wie Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA, Ligation von DNA-Fragmenten, Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA, PCR, Agarosegelelektrophorese von DNA wurde entsprechend der Angaben in Sambrook et al. durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Die Plasmidpräparation aus Bakterienzellen wurde für analytischen Zwecke nach der von Birnboim und Doly beschriebenen Methode durchgeführt (Birnboim and Doly, 1979). Größere Plasmidmengen wurden mit dem Qiagen-Plasmidextraktions-Kit entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

3.1.1 DNA-Transfer in E. coli Bakterien

3.1.1.1 Medien für E. coli Kulturen

TY- Medium:	Bacto-Trypton	1,6 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	NaCl	86 mM
LB- Medium: „Luria- Bertani“	Bacto-Trypton	1 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	NaCl	86 mM

Diese Medien wurden in der angegebenen Zusammensetzung sowohl als Flüssigmedien als auch, unter Zusatz von 2 % Agar, als Festmedien verwendet. Bei Bedarf wurden dem autoklavierten Medium folgende Antibiotika zugesetzt.

	<u>Stammlösungen</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
Ampicillin	40 mg/ml in a. dest.	80 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in Ethanol	12,5 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in a. dest.	50 µg/ml
Gentamicin	10 mg/ml in a. dest.	7 µg/ml

3.1.1.2 Herstellung kompetenter E.coli Bakterien

Elektrokompetente Zellen

Um elektrokompetente Zellen herzustellen, wurde eine Übernachtskultur des betreffenden Stammes 1:100 in TY-Medium umgesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 weiterkultiviert. Nach Abkühlung der Kultur auf Eis für 15 bis 30 min wurden die Zellen bei 4000 x g für 15 min (4 °C) pelletiert. Danach folgte die Resuspension in 1 Volumen kaltem, sterilem a. dest. und erneute Zentrifugation. Die Zellen wurden in zwei weiteren Schritten gewaschen (1. Schritt: 1/2 Vol. a. dest., 2. Schritt: 1/50 Vol. 10 % Glycerin) und in 1/500 Volumen 10 % Glycerin aufgenommen. Die Aufbewahrung erfolgte in Aliquoten bei -70 °C.

Chemisch kompetente Zellen

Eine E. coli-Übernachtskultur wurde 1:100 in TY-Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde 5 min auf Eis gekühlt und 1 min bei 7000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml 0,1 M CaCl₂ (0 °C) resuspendiert, 30 min bei RT inkubiert und erneut 1 min bei 7000 rpm zentrifugiert, wobei kompetente Zellen ein ringförmiges Pellet bilden. Danach folgte die Resuspension in 0,2 ml vorgekühltem CaCl₂ (0,1 M). Die Zellen wurden kühl gelagert und nach 0,5 h - 48 h für Transformationen verwendet.

3.1.1.3 Transformation von kompetenten E. coli Bakterien

Elektrotransformation

Für die Elektrotransformation der Zellen wurden in einer gekühlten 2 mm Elektroporationsküvette 40 µl elektrokompetente Zellen mit 1 µl in a. dest. gelöster DNA versetzt. Die Elektroporation erfolgte durch das kurzzeitige Anlegen von 2,5 kV (PEQLab Gene Pulser, Kapazität: 25 µF, Widerstand: 200 Ω). Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 ml vorgewärmten TY-Medium resuspendiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf TY-Agar unter entsprechendem Selektionsdruck ausplattiert wurden.

CaCl₂-Transformation

100 µl chemisch kompetente E. coli Zellen wurden mit der DNA gemischt und 30 min bei 0 °C inkubiert. Die Aufnahme der DNA wurde durch Hitzeschock (42 °C, 2 min) ausgelöst. Die transformierten Zellen wurden 1 h bei 37 °C geschüttelt und auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsdruck ausgespatelt.

3.1.1.4 Schüttel-und Dauerkulturen von E. coli Bakterien

Die Kultivierung von E. coli fand standardgemäß in TY-Medium oder LB-Medium, jeweils mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen, bei 37 °C und bei Verwendung von Flüssigmedium auf einem Schüttler (190- 240 rpm) statt. Die Kultivierung auf TY- oder LB-Agar erfolgte im Brutraum (37 °C) über Nacht.

Für die Konservierung der Bakterienstämme wurden Submerskulturen mit 20 % (v/v) Glycerin versetzt und bei – 70 °C aufbewahrt.

3.1.1.5 Erzeugung rekombinanter Bacmide

Das Donorplasmid pFastBac1 mit dem gewünschten Insert wurde in chemisch kompetente DH10Bac-E. coli-Zellen transformiert. DH10Bac-Zellen enthalten so genannte Bacmide, zirkuläre baculovirale DNA-Moleküle. Durch ortsspezifische Rekombination wird ein Insert aus pFastBac1 auf das Bacmid übertragen. Beim Rekombinationsvorgang wird die DNA-Sequenz, die für das LacZ α -Peptid kodiert, aus dem Bacmid entfernt. Die transformierten DH10Bac-E. coli-Zellen wurden auf Agarplatten mit Kanamycin, Gentamicin, Tetracyclin, X-Gal und IPTG ausplattiert. Weiße Kolonien wurden nach 48 h Inkubation bei 37 °C selektiert und ihre Bacmid-DNA isoliert.

3.2 Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen

3.2.1 Kultivierung von Zelllinien

HEK293

HEK293 wurden in DMEM / HAMS-F12 / 10 % (v/v) FBS bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten. Alle 2 - 3 Tage wurden das Medium ersetzt und konfluente Zellen mindestens einmal wöchentlich die konfluenten Zellen mittels Trypsin/EDTA im Verhältnis 1:20 gesplittet.

RBL2-H3

RBL-H2 Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FBS bei 37 °C und 3 % CO₂ in Kultur gehalten. Alle 2 - 3 Tage wurden das Medium ersetzt und die adhären Zellen mittels Trypsin/EDTA im Verhältnis 1:20 gesplittet.

SF-9-Zellen

SF-9-Zellen wurden bei 27°C in Kultur gehalten. Als Wachstumsmedium wurde SF-900 II mit 10 % (v/v) FBS verwendet. Die konfluenten Zellen wurden alle 4 Tage im Verhältnis 1:10 gesplittet.

3.2.2 Transfektion

3.2.2.1 Kalziumphosphat-Methode (HEK 293-Zellen)

(nach Chen and Okayama, 1987)

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-well-plates ($1,5 \times 10^5$ Zellen pro well) in Transfektionsmedium (DMEM serumfrei) umgesetzt.

Pro well wurden 4 µg in a.dest gelöste DNA eingesetzt. Zur DNA-Lösung wurde 100 µl CaCl_2 -Lösung (2,5 M) und 100 µl BBS-Puffer gegeben und die Lösung für 10-20 min bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde dann auf die Zellen gegeben und diese über Nacht bei 37 °C und 3 % CO_2 inkubiert. Am Tag nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch recovery-Medium (50 % (v/v) DMEM / 50 % (v/v) HAMS F12, 0,5 % (v/v) FBS) ersetzt und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

3.2.2.2 Elektroporation (RBL2H3-Zellen)

Adhärente Zellen wurden mit Trypsin behandelt, in 5 ml RPMI-Medium aufgenommen, 5 min bei 1200 rpm pelletiert und in 400 µl RPMI-Medium resuspendiert. Danach wurden 20 µg Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben und der Ansatz 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Elektroporation wurde die Zellsuspension in sterile Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 4 mm überführt und mit dem "gene pulser" von BIORAD elektroporiert (Spannung 250 V; Kapazität 960 µF; Widerstand ∞).

Nach 10-minütiger Inkubation wurde der Ansatz in 12 ml Wachstumsmedium resuspendiert und in eine 6-well-Platte überführt. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die transfizierten Zellen 24 h bei 37 °C kultiviert.

3.2.2.3 Transfektion mit rekombinanten Bacmiden

Zur Produktion rekombinanter Baculoviren wurden SF-9-Zellen mit den entsprechenden rekombinanten Bacmiden transfiziert. Dafür wurden in einer 6-well-Platte 9×10^5 Zellen ausgesät und zur Adhäsion 1 h bei 27 °C inkubiert. Parallel wurden 1 µg Bacmid-DNA mit 6 µl Cellfectin® in 200 µl serumfreiem SF-900 II 30 min inkubiert.

Die Zellen wurden mit 2 ml serumfreiem SF-900 II gewaschen, die Lipid-DNA-Komplexe wurden mit serumfreiem SF-900 II auf 1 ml aufgefüllt und auf die Zellen gegeben. Nach 5 h Inkubation bei

37 °C wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch 2 ml SF-900 II mit 10 % (v/v) FBS ersetzt. Nach 72 h wurde der Überstand steril entnommen, 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das so gewonnene Viruslysats wurde zur Infektion weiterer Zellen verwendet, um den Titer der Viruspartikel zu erhöhen.

3.2.2.4 Infektion von SF-9-Zellen

Am Tag vor der Infektion wurden 3×10^5 SF-9-Zellen/cm² Wachstumsfläche ausgesät. Zur Infektion wurden je nach Virustiter 0,1 - 1 µl Viruslysats/cm² Wachstumsfläche ins Medium gegeben. Die Zellen wurden zur Produktion der rekombinanten Proteine für 72 h bei 37 °C inkubiert und anschließend lysiert.

3.2.3 Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien

Mit der Selektion der transfizierten Zellen wurde standardgemäß 1 -2 Tage nach der Transfektion begonnen. Als Selektionsmittel diente für HEK293-Zellen und RBL2H3-Zellen das Antibiotikum Geneticin in der Konzentration 1 mg/ml. Die Zellen wurden bis zu ca. 80 % Konfluenz in 6-well-Platten kultiviert, danach trypsiniert, eine stark verdünnte Zellsuspension hergestellt (10 Zellen/ml) und in 96-well-Platten (100 µl/well) umgesetzt. Die theoretische Verteilung der Zellen lag bei einer Zelle pro well, was zur Entstehung von Klonen aus einzelnen Zellen führte. Durch weiteres Wachstum dieser Zellen entstand eine homogene Zellpopulation, die durch dauerhaften Selektionsdruck von Geneticin ausschließlich aus transfizierten Zellen bestand. Die etablierten stabilen Zelllinien wurden durch Kultivierung in Gegenwart von G418 aufrecht gehalten.

3.2.4 Isolierung neutrophiler Granulozyten aus humanem Vollblut

Zur Aufreinigung neutrophiler Granulozyten wurde peripheres Citrat-Blut freiwilliger Spender verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Vollblutkonserven wurden aus dem Institut für Transfusionsmedizin der FSU Jena bezogen. Zur ersten Abtrennung der Erythrozyten wurde das Blut 1:1 mit PBS / 2 % (v/v) Dextran gemischt und in Falconplastikgefäße aliquotiert. Nach 45 min Inkubation bei Raumtemperatur war der Großteil der Erythrozyten sedimentiert. Der Überstand wurde zu je 40 ml in neue Falcongefäße gegeben und mit 5 ml Histopaque unterschichtet. Bei anschließender Zentrifugation (30 min, 18 °C, 800 g) erfolgte die Trennung der Granulozyten und restlichen Erythrozyten von den mononukleären Blutzellen (s. Abb. 3.1).

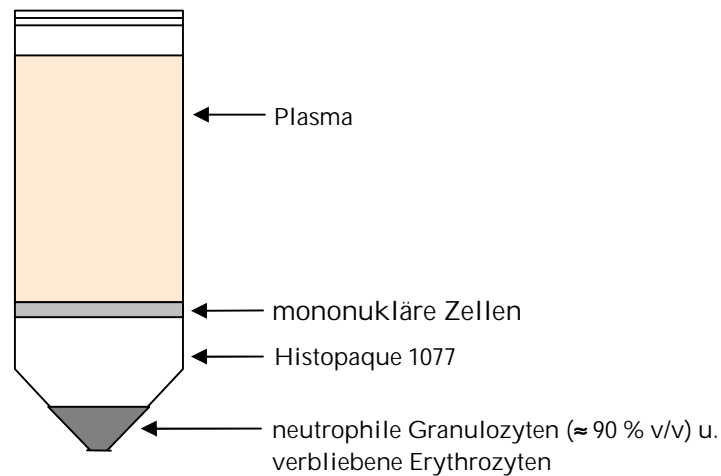


Abb. 3.1: Auftrennung der Blutbestandteile nach der Gradientenzentrifugation
Nach der Zentrifugation befinden sich Granulozyten und Erythrozyten im Pellet. Mononukleäre Zellen lagern sich als dünne Schicht über dem Histopaque ab.

Der Überstand wurde verworfen und die im Pellet befindlichen Granulozyten und Erythrozyten mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Lyse der verbliebenen Erythrozyten mit 5 ml a. dest. für 30 s. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml 1,8-%iger NaCl-Lösung abgestoppt. Nach zweimaliger Wäsche mit PBS wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Boyden-Neubauerkammer bestimmt und die neutrophilen Granulozyten standen für weitergehende Experimente zur Verfügung.

3.3 Proteinanalytische Methoden

3.3.1 Lyse von Zellen

Die Zellen wurden vor der Lyse mit PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer, das sich nach der Größe der Zellkulturflasche bzw. Zellmenge richtete, lysiert. Die Lyse der Zellen erfolgte in Gegenwart des Detergens NP-40. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während die Zellkerne und übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden. Es wurden unterschiedlich zusammengesetzte Lysepuffer verwendet und alle Proteaseinhibitoren direkt vor Gebrauch zugegeben.

Lysepuffer:

neutrophile Granulozyten:	20 mM Tris-HCl pH 8,0; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; 0,5% NP40; 10% (v/v) Glycerin, 0,5 mg/ml BSA; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 1 mM PMSF; 21 µg/ml Aprotinin; 12 µg/ml AEBSF; 5 µg/ml Leupeptin; 5 µg/ml Pepstatin A; 5 µg/ml Benzamidin
---------------------------	--

RBL2H3- und HEK293-Zellen: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂; 0,1% NP40, 2 mM Aprotinin; 10 mM Leupeptin; 1 mM Pepstatin A; 1 mM PMSF

SF-9 Zellen: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 25 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 1% NP-40, 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM Na₃VO₄; 2 mM Aprotinin; 10 mM Leupeptin; 1 mM Pepstatin A

Nach 5-10 min auf Eis wurde das Zelllysat gesammelt und in 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäße überführt. Nach der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile mittels Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, 4 °C), wurde der Überstand, der alle zytosolischen und membranständigen Proteine enthält, in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zum Erstellen einer Eichkurve wurden BSA-Standard-Lösungen mit den Konzentrationen 1, 2, 5, 10, 50 und 100 µg/ml BSA (in a. dest.) hergestellt. Jeweils 200 µl dieser Lösung wurden mit 800 µl Roti-Nanoquant Arbeitslösung versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Von der zu bestimmenden Proteinlösung wurden 2 µl mit a. dest. auf 200 µl aufgefüllt und mit 800 µl Nanoquant Arbeitslösung gemischt. Für alle Proben wurde am Spektrometer „Ultrospec 3300 pro“ (Amersham Biosciences) die OD₅₉₀ und OD₄₅₀ bestimmt. Der Quotient OD₅₉₀/OD₄₅₀ wurde gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen und der Proteingehalt mit Hilfe der Eichgeraden berechnet.

3.3.3 Immunopräzipitation von Proteinen

Die Immunopräzipitation dient zur Anreicherung eines Proteins aus dem Zelllysat und wird mit proteinspezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Isolierung fand abhängig vom Zelltyp im entsprechenden Lysepuffer statt (s. 3.3.1) Im ersten Schritt, der der Antikörper-Antigenbindung diente, wurde das Zelllysat bei 4°C unter permanenter Über-Kopf-Rotation der Reaktionsgefäße für 2 h mit 1 µg - 3 µg des jeweiligen Antikörpers inkubiert. Nach einem zweiten zweistündigen Inkubationsschritt mit Gamma-bind-G-Sepharose wurde der Sepharose-Antikörper-Protein-Komplex durch anschließende Zentrifugation für 3 min bei 1200 rpm sedimentiert. Nach 2 - 3 - maliger Wäsche in eiskaltem Lysepuffer wurden der Überstand vollständig von der Sepharose entfernt und diese in 2-fach Probenpuffer aufgenommen. Die Eluierung und Denaturierung der Proteine erfolgte bei 95 °C für 5 min.

3.3.4 Reinigung Epitop-markierter Proteine

3.3.4.1 Tandem Affinity Purification

(nach Puig et al., 2001)

Die Tandem Affinity Purification verfügt gegenüber herkömmlichen Reinigungsmethoden über zwei entscheidende Vorteile. Zum einen werden Proteinkomplexe unter physiologischen, nativen Bedingungen aufgereinigt und zum anderen umfasst sie aufgrund des dualen Charakters des TAP-Epitops zwei unterschiedliche aufeinander folgende Affinitätsreinigungsschritte des Zielproteins. Das Epitop besteht aus zwei IgG-bindenden Domänen des Protein A aus *Staphylococcus aureus* (ProtA) und einem Calmodulin-Bindepeptid (CBP). Beide Teilstücke sind durch eine spezifische TEV-Protease Erkennungssequenz (TEV) voneinander getrennt (s. Abb. 1.6). Die zwei Reinigungsschritte ermöglichen eine hohe Reinheit und Spezifität isolierter Proteinkomplexe. Ein einzelner Isolierungsschritt reicht meist für die vollständige Eliminierung unspezifisch gebundener Proteine nicht aus.

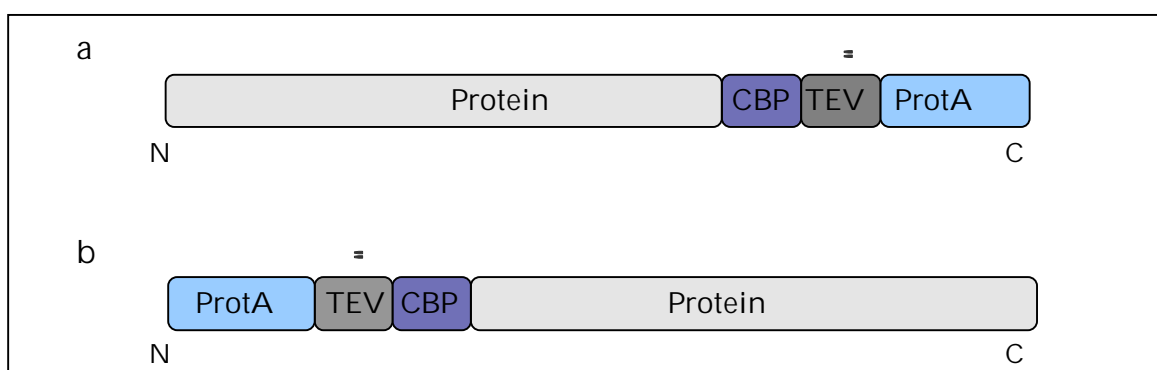


Abb. 1.6: Schematischer Aufbau der TAP-Epitope

Das TAP-Epitop kann entweder C-terminal (a) oder N-terminal (b) lokalisiert sein. Jeweils distal befindet sich die Protein-A-Domäne (ProtA), die vom Calmodulin-Bindepeptid (CBP) durch eine TEV-Protease Erkennungssequenz (TEV) getrennt ist.

Beim ersten Reinigungsschritt wird das Protein über die Bindung des Protein-A-Epitops an IgG-gekoppelte Agarose (3 x mit NP40-Puffer gewaschen) angereichert. Die Bindung erfolgt in NP40-Puffer (6 mM Na_2HPO_4 ; 4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1 % NONIDET P-40; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA; 50 mM NaF; 4 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin; 0,1 mM Na_3VO_4). Der Ansatz wurde unter Rotation für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Sedimentation des Komplexes erfolgte durch Zentrifugation für 1 min bei 3000 rpm. Die Agarose wurde 3 x mit IPP 150-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % NP-40) und zur Umpufferung anschließend mit TEV-Cleavage-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % NP-40; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT) gewaschen.

Für den zweiten Reinigungsschritt wurde das Zielprotein wieder in Lösung gebracht. Dafür wurde das Material in 300 µl TEV-Cleavage-Puffer mit 15 U TEV-Protease aufgenommen und für 3-4 h unter ständigem Schütteln bei 16 °C inkubiert.

Die löslichen CBP-markierten Proteine befanden sich dann im Überstand und konnten im zweiten Reinigungsschritt über Calmodulin-Sepharose wieder angereichert werden. Die Sepharose wurde mit Calmodulin-binding-Puffer (CBB: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM Mg²⁺ Acetat; 1 mM Imidazol; 2 mM CaCl₂; 10 mM β-ME) gewaschen und in einem 1:4 Gemisch aus Proteinlösung und CBB 1-2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Calmodulin-Sepharose wurde 3 x in CBB gewaschen und in 2-fach Probenpuffer aufgenommen. Die Probe wurde für 5 min bei 95 °C gekocht und stand zur weiteren Analyse über SDS-PAGE zur Verfügung.

3.3.4.2 Flag-His-Reinigung

Auch diese Reinigungsmethode erlaubt eine Reinigung von Fusionsproteinen über zwei aufeinander folgende, unabhängige Reinigungsschritte.

Im ersten Schritt wird das Fusionsprotein an FLAG-Beads gebunden. Dafür werden die FLAG-Beads 1 x in 0,1 M Glycin pH 3,5 und danach 2 x in IPP150 Puffer gewaschen und unter Rotation für 1 h bei 4 °C mit dem Zelllysat inkubiert. Anschließend wurden die FLAG-Beads 2 x in IPP150 Puffer gewaschen. Die Elution der Fusionsproteine erfolgt in 500 µl IPP150 Puffer und in Gegenwart von 150 µg/ml FLAG-Peptid für 2 x 20 min bei 4 °C. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und vereinigt. Im zweiten Reinigungsschritt wurde das Fusionsprotein über das His-Teilstück des Epitops an Ni-NTA-Agarose gebunden. Dafür wurden 50 µl Beads 2 x in IPP150 Puffer gewaschen und unter Rotation für 1 h bei 4 °C mit den FLAG-Elutionen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Agarose wurden die Proben in 2-fach Probenpuffer aufgenommen und für 5 min gekocht.

3.3.4.3 GST-Reinigung

Für die Reinigung GST-markierter Proteine wurden 20 µl Glutathion (GT) - Sepharose für Co-Reinigungsexperimente bzw. 100 µl für präparative Zwecke zweimal mit Lysepuffer (0,1 % NP-40) gewaschen, zu den geklärten Lysaten gegeben und 1 h bei 4 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Für Co-Reinigungsexperimente wurde das Lysat abgenommen und die Sepharose 3 x für 5 min mit 500 µl Tween-Waschpuffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0,05 % Tween20) gewaschen und 20 µl 2-fach Probenpuffer aufgenommen.

Für präparative Zwecke wurde das Lysat inklusive GT-Sepharose auf eine 1 ml-Polypropylensäule überführt. Nach dem Durchfluss des Lysats wurden die GT-Sepharose zunächst mit GST-Waschpuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM DTT) gewaschen und mit 3 × 80 µl

GST-Elutionspuffer (GST-Waschpuffer + 10 mM reduziertes Glutathion) eluiert. Die Elutionen wurden bei 4 °C oder bzw. nach Zugabe von 50 % (v/v) Glycerin bei –20 °C gelagert.

3.3.4.4 His-Reinigung

Zur Bindung der His-Epitop-markierten Proteine wurden 100 µl Ni-NTA-Agarose mit 1 ml PBS gewaschen, zum geklärten Lysat gegeben und 1 h bei 4 °C rotiert. Der Reinigungsansatz wurde dann auf eine 1 ml-Polypropylensäule überführt. Nach dem Durchfluss des Lysats wurde das Säulenmaterial mit 2 ml PBS und 5 ml His-Waschpuffer (20 mM HEPES pH 7,5; 200 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 20 mM Imidazol) gewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden 5 × 100 µl His-Elutionspuffer (His-Waschpuffer mit 200 mM Imidazol) auf die Säule gegeben und getrennt gesammelt. Die Elutionen wurden bei 4 °C oder mit 50 % (v/v) Glycerin bei –20 °C gelagert.

3.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(nach Laemmli, 1970)

SDS-PAA-Gele bieten die Möglichkeit Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufzutrennen. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7 - 15-%ige SDS-PAA-Gele hergestellt. Nach ihrer Polymerisation wurden die Trenngele mit einem 5-%igem Sammelgel überschichtet. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einer BioRad-Apparatur bei konstanter Stromstärke von 30 mA/Gel.

3.3.6 Blue-Native-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die in dieser Arbeit verwendete Methode beruht auf einer abgewandelten Form, der von Schagger und Jagow entwickelten Blue Native Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen und Proteinkomplexen in ihrer nativen und enzymatisch aktiven Form (Schagger et al., 1988). Dabei werden die Proteine von Brilliant Blau G250 ummantelt und erhalten eine negative Ladung, die eine Auftrennung im elektrischen Feld erlaubt.

Verwendete Lösungen:

BN-Probenpuffer:	100 mM Bis-Tris pH 7,0; 500 mM 6-Aminocaprinsäure; 6% (v/v) Sucrose; 5 % (v/v) Brilliant Blau G250
Anodenpuffer:	50 mM Bis-Tris, pH 7,0
Kathodenpuffer:	50 mM Tricin; 15 mM Bis-Tris, pH 7,0
Blau-Kathodenpuffer:	50 mM Tricin; 15 mM Bis-Tris, pH 7,0; 0,01% (v/v) Brilliant Blau G250

AB-Mix:	Acrylamid 49.5% (v/v) T; Bisacrylamid 3% (v/v) C in H ₂ O
3 x Gel-Puffer:	150 mM Bis-Tris; 1,5 M 6-Aminocaprinsäure; pH 7,0
Sammelgel:	4 % (v/v) Acrylamid; 150 mM Bis-Tris pH 7,0; 500 mM 6-Aminocaprinsäure
Trenngel:	5 - 13,5 % Acrylamid; 150 mM Bis-Tris pH 7,0; 500 mM 6-Aminocaprinsäure

Für die BN-PAGE wurden native Gradiententrenngele von 5 - 13,5 % hergestellt. Das Trenngel wurde mit einem 4-%igem Sammelgel überschichtet. Alle folgenden Schritte fanden bei einer Temperatur von 4 °C mit vorgekühlten Puffern statt.

Die gewünschten Zellen wurden unter Standardbedingungen lysiert. 300 µl des geklärten Zelllysates wurde mit 30 µl BN-Probenpuffer versetzt und über eine Amicon 10K-Säule konzentriert. Die Proben wurden in Gegenwart von Brilliant Blau G250 über das native Gradientengel separiert. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 50 V. Wenn die Laufrfront etwa ein Drittel bzw. die Hälfte des Gels erreicht hat, wurde der Blau-Kathodenpuffer gegen farbstofffreien Kathodenpuffer ausgetauscht und die Auftrennung fortgesetzt bis die Laufrfront das Gelende erreicht hat. Als Kontrolle wurden die Molekulargewichtsstandards BSA (66 und 132 kDa) und Ferritin (440 und 880 kDa) eingesetzt.

Nach Beendigung des Laufes wurden die einzelnen Spuren ausgeschnitten und die Gelstreifen in 2-fach Probenpuffer 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Spur des BN-PAGE wurde horizontal auf ein SDS-PAA-Gel aufgelegt und in das Sammelgel eingebettet. Die Proteine wurden dann in der zweiten Dimension über SDS-PAGE entsprechend ihres Molekulargewichts getrennt (s. 3.3.5).

3.3.7 Färbung und Entfärbung von PAA-Gelen

3.3.7.1 Comassiefärbung

Die Anfärbung der Gele fand unter leichtem Schütteln für 15 - 30 min in Färbelösung statt. Die Entfärbung erfolgte durch Schütteln in Entfärbelösung bis zum Erreichen eines nahezu farblosen Hintergrunds. Bei Bedarf wurden die Gele unter Vakuum in einem BioRad-Geltrockner für 0,5 - 2 h bei 80 - 90 °C getrocknet.

3.3.7.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung von PAA-Gelen wurde entsprechend der Methode von Shevchenko et al. durchgeführt (Shevchenko et al., 1996). Diese Färbemethode erlaubt anschließend den proteolytischen Verdau der Proteine zur massenspektrometrischen Analyse.

Die Entfärbung erfolgte unter Schütteln bis zur sichtbaren Entfärbung in 30 mM Kaliumhexacyanoferrat /100 mM Natriumthiosulfat.

3.3.8 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Zur Immunodetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine PVDF-Membran transferiert (Gershoni and Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transfer-Puffer für 2 h bei konstant anliegenden 50 Volt in einer BioRad Blotapparatur.

3.3.9 Immunodetektion von Proteinen

Bei der Immunodetektion wurden die auf der PVDF-Membran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern, wurde diese für 1 h in NET-G Puffer blockiert. Zur Detektion der Proteine wurden dann sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper eingesetzt (mittels Immunopräzipitation isolierte Proteine wurden nie mit dem für die Reinigung verwendeten Antikörper detektiert), die in angeführter Konzentration in NET-G Puffer verdünnt waren (s. 2.1.9). Die Inkubation erfolgte meist über Nacht unter konstantem Schütteln bei 4°C. Nach 3-maligem Waschen für 10 min (in ebenfalls NET-G Puffer) folgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper und wiederum dreimaliges Waschen. Die Sichtbarmachung der Proteine fand dann mit dem „ECL-Reagenz der Firma Perkin Elmer Life Science statt (500 µl Oxidizing Reagent und 500 µl Enhanced Luminol Reagent). Die enzymatische Reaktion am sekundären Antikörper, welche zur Chemilumineszenz führt, wurde entweder mit einem CL-XPosure Film (Pierce) oder alternativ mit dem LAS 1000 (FUJIFILM) detektiert. Die Signale wurden mit der AIDA-Software (advanced image data analysis, Fujifilm) quantifiziert.

3.3.10 Massenspektrometrie

3.3.10.1 In-Gel-Fragmentierung von Proteinen und Elution der Peptide

(modifiziert nach Mortz et al. 1994)

Durch Proteinfärbung sichtbare Proteinbanden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel isoliert, entfärbt und zur SDS-Entfernung 4 x in a. dest. unter Schütteln gewaschen.

Anschließend erfolgte für 20 min die Dehydrierung der Gelstücke in Acetonitril-Wasser (3:2). Nach Abnahme des Überstandes wurde die verbliebene Flüssigkeit in der Vakuumzentrifuge eingedampft. In 30 - 50 µl 50 mM NH_4HCO_3 wurden die Gelstücke rehydriert. Beginnend mit der Dehydrierung wurden alle Schritte zweimal wiederholt.

Zum proteolytischen Verdau der Proteine wurde im letzten Rehydrierungsschritt Trypsinlösung (60 ng/µl Trypsin in 50 mM NH_4HCO_3) eingesetzt. Die Lösung wurde zu je 10 - 15 µl auf die Gelstücke gegeben, so dass diese nahezu bedeckt waren. Nachdem die Trypsinlösung von den Gelstücken aufgenommen wurde, folgte die Zugabe von 30 - 50 µl 50 mM NH_4HCO_3 . Die Proben wurden für 15 min bei 30 °C und danach bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Inkubationslösung wurde am nächsten Tag in frische Eppendorfreaktionsgefäßen überführt. Zur Extraktion der Peptide wurden die Gelstücke zweimal für 45 min in 50 - 70 µl Acetonitril-Wasser (3:2) geschüttelt. Alle Überstände wurden im Eppendorfreaktionsgefäßen zusammengeführt, die gesamte Flüssigkeit in der Vakuumzentrifuge eingedampft und die Proben bei -80 °C bis zu massenspektrometrischen Analyse gelagert.

3.3.10.2 Massenspektrometrische Analyse

Die Proben wurden über die „Nano LC ESI/MS“-Methode im Massenspektrometer LCQ Deca XP (Thermo Finnigan) gemessen. Dabei werden die Proben vor der Transferierung in das Massenspektrometer durch ein „capillary nano HPLC System“ (LC Packings, Dionex) aufgenommen und über eine C18-Nanosäule vorgetrennt. Die Ionisierung der Proben erfolgt mittels Elektronenspray. Als Messprogramm wurde Xcalibur (Thermo Electron Corporation) verwendet.

Die Auswertung wurde mit Hilfe der SeQuest-Analyse-Software (The Scripps Research Institute) vorgenommen.

3.3.11 Zellfraktionierung zur Gewinnung von Zytosol und Zellmembranen

Neutrophile Zellen wurde aus humanen Vollblut isoliert (s. 3.2.4), zu je 3×10^7 Zellen in Resuspensionspuffer eingestellt und gegebenenfalls stimuliert. Die Zellen wurden dann in 1 ml Fraktionierungspuffer (25 mM HEPES; 25 mM β -Glycerophosphat; 2 mM EDTA; 0,5 mg/ml BSA; 1

mM Na_3VO_4 ; 1 mM PMSF; 21 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin; 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin; 5 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin A; 5 $\mu\text{g/ml}$ Benzamidin; 12 $\mu\text{g/ml}$ AEBSF) aufgenommen. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte in einem vorgekühlten Dounce Homogenisator. Zur Abtrennung unaufgebrochener Zellen wurde die Probe in ein 1,5ml Eppendorftube überführt und 5 min bei 500g zentrifugiert. Zur Trennung der Fraktionen wurde der Überstand für 45 min bei 4°C und 100 000 g zentrifugiert. Die als Pellet vorliegende Membranfraktion konnte dann von der zytosolischen Fraktion (Überstand) getrennt und in 2-fach Proben-Puffer resuspendiert werden.

3.3.12 Bestimmung der O_2^{\bullet} -Produktion in neutrophilen Granulozyten

Mit der Lucigenin abhängigen Chemilumineszenz ist es möglich, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite (hauptsächlich O_2^{\bullet}) zu messen. Dafür wurden frisch isolierte neutrophile Granulozyten in HBSS gewaschen und zu je 1×10^6 Zellen in HBSS / 0,1 % BSA eingestellt. Nach Zugabe von Lucigenin (Endkonzentration 200nM) wurden die Proben in vorgewärmte Opti-Plates gegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Direkt nach Zugabe des jeweiligen Stimulus erfolgte die Messung der O_2^{\bullet} -Produktion in dreifacher Bestimmung (MicroLumat Plus, Perkin Elmer). Die Messungen erfolgten über max. 25 min. Als Negativkontrolle (Blank) wurde DMSO verwendet. Das Ergebnis wurde als integrierte Intensitäts-Zählung angegeben (URL/s = relative Units/s).

3.3.13 In vitro-Kinase-Assay

Zur Untersuchung der Kinaseaktivität wurde [γ - ^{32}P]-ATP eingesetzt, dessen radioaktiv markierte γ -Phosphatgruppe von Kinasen auf Proteine oder Lipide übertragen wird. Die gereinigten rekombinanten Proteine und gegebenenfalls Inhibitoren wurden mit Kinase-Assay-Puffer (50 mM; HEPES, pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl_2 ; 1 mM EGTA) auf ein Gesamtvolumen von 40 μl gebracht. Nach einer Vorinkubation bei 37 °C für 3 min wurden 10 μl ATP-Puffer (Kinase-Assay-Puffer mit 125 μM Mg^{2+} -ATP und 3 μCi [γ - ^{32}P]-ATP) zugegeben und der Ansatz 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 μl 2-fach Probenpuffer auf Eis gestoppt. Die Proben wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und das PAA-Gel anschließend mit Wasser gewaschen und 30 min in Fixierlösung (50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 40 % (v/v) a. dest.) fixiert. Zur Detektion der Radioaktivität wurde das fixierte PAA-Gel mit Plastikfolie abgedeckt und eine image plate aufgelegt. Nach einer 48-stündigen Exposition wurde die image plate mit dem Phosphoimager FUJIFILM FLA-5000 ausgelesen und die Proteinbanden mit dem Programm AIDA (advanced image data analysis, Fujifilm) quantifiziert.

3.3.14 Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie

Zur Extraktion der Lipide wurden Kinase-Assay-Proben (50 µl) nach der 15-minütigen Inkubation bei 37 °C mit 400 µl Chloroform: Methanol: 10 mM HCl (1: 2: 1), 150 µl 10 mM HCl und 150 µl Chloroform versetzt. Nach Homogenisation und kurzer Zentrifugation wurde die organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Lösungsmittel in einem Vakuumkonzentrator „Speedvac“ (Savant) entfernt. Die verbliebenen Lipide wurden in 25 µl Chloroform resuspendiert. Dünnschichtchromatographieplatten LK6DF Silica-Gel 6 Å (Whatman) wurden mit 1 % Kaliumoxalat vorbehandelt und anschließend die Chloroform-Lipid-Suspension aufgetragen. Als Laufmittel wurde Chloroform: Methanol: Aceton: Essigsäure: Wasser verwendet (80: 26: 30: 24: 14). Die Auswertung erfolgte mit dem Phosphoimager FUJIFILM FLA-5000.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Tandem Affinity Purification für PI3K γ und sein Adapterprotein p101 in Säugerzellen

Um Interaktionspartner von PI3K γ zu identifizieren, sollten über die Isolierung von PI3K γ potentiell assoziierte Interaktionspartner unter physiologischen Bedingungen aus Zellen co-gereinigt und über massenspektrometrische Methoden analysiert werden. Dafür wurde die Tandem Affinity Purification (TAP) verwendet. Die Tandem Affinity Purification ist eine Methode, welche von Rigaut et al. zur Reinigung natürlicher Proteinkomplexe entwickelt wurde (Rigaut et al., 1999). Die Einführung eines dualen TAP-Epitops ermöglicht zwei unterschiedliche aufeinander folgende Reinigungsschritte unter physiologischen Pufferbedingungen. Dabei wird eine hohe Reinheit und Spezifität des zu isolierenden TAP-Epitop-markierten Proteins und seiner Interaktionspartner gewährleistet (Cox et al., 2002). Die Methode wurde von Gavin et al. in high throughput Experimenten zur Untersuchung multifunktionaler Proteinkomplexe in Hefe angewendet (Gavin et al., 2002). Für Säugerzellen war diese Reinigung wenig etabliert. Unter Verwendung von PI3K γ als Modellprotein sollte diese Methode für Säugerzellen angepasst werden, um anschließend Interaktionspartner von PI3K γ identifizieren zu können.

Erste Erfahrungen zur Anwendung der Tandem Affinity Purification in diesem System lagen am MPI Freiburg vor. Zwar war es Elis et al. nicht gelungen, über TAP-Epitop-markierte PI3K α oder PI3K β mögliche Bindungspartner zu isolieren, doch die Verwendung des TAP- Epitop-markierten Adapterproteins p85 ermöglichte die Isolierung der katalytischen Untereinheiten PI3K α , β und δ sowie assoziierter Bindungspartner (Elis et al., MPI Freiburg, mündliche Mitteilung). Basierend auf diesen Resultaten sollte zusätzlich TAP-Epitop-markiertes Adapterprotein p101 erzeugt werden.

4.1.1 Klonierung der Hybridgene

Wie Puig et al. gezeigt haben, kann die Lokalisierung des Epitops am Protein Einfluss auf die Effizienz nachfolgender Reinigungsschritte nehmen (Puig et al., 2001). Deshalb wurden für PI3K γ sowohl eine C-terminal als auch eine N-terminal TAP-Epitop-markierte Variante hergestellt (PI3K γ -TAP bzw. TAP-PI3K γ). Für p101 wurde die N-terminale Lokalisierung des TAP-Epitops gewählt. Als methodischer Vergleich wurde C-terminal Flag-His-markiertes PI3K γ hergestellt (Abb. 4.1). Das Flag-His-Epitop erlaubt ebenso wie das TAP-Epitop die Isolierung des Proteins über zwei aufeinander folgende Affinitätsreinigungsschritte. Ziel der Untersuchung war es, beide Reinigungsmethoden zu vergleichen. Als Expressionsvektoren wurden pcDNA3 bzw. pCMV

ausgewählt. In allen Plasmiden befanden sich die Hybridgene unter der Kontrolle des konstitutiven pCMV-Promotors. Die Plasmide enthielten eine Geneticin-Resistenz-Kassette zur späteren Selektion transfizierter Säuger-Zellen.

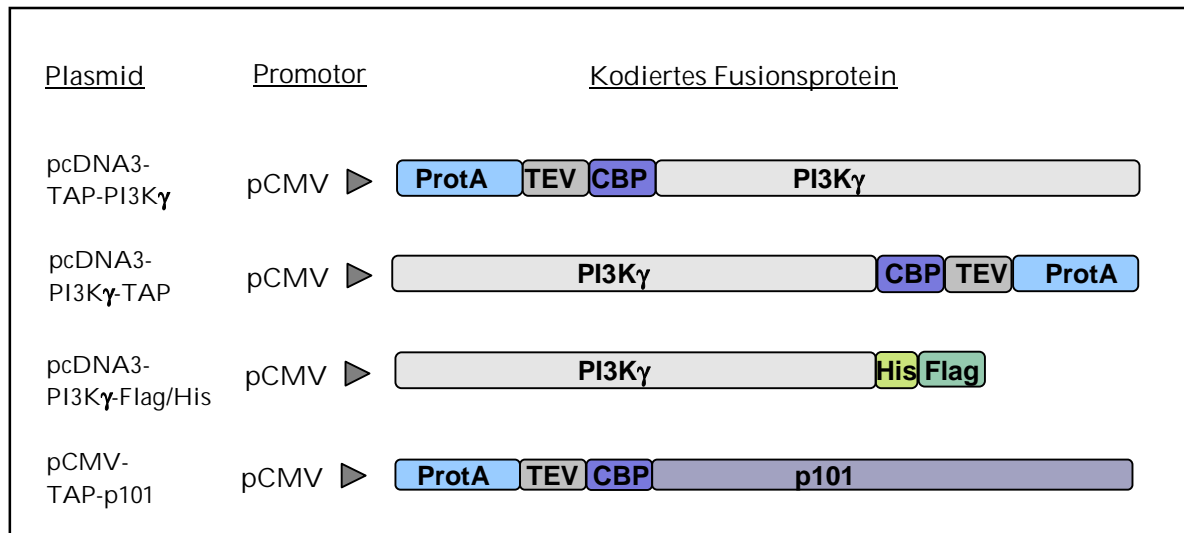


Abb. 4.1: Übersicht über erstellte Plasmide zur Synthese Epitop-markierter Fusionsproteine
Es wurden pcDNA3-Plasmide hergestellt, die entweder für N- oder C-terminal TAP-markiertes bzw. für C-terminal Flag-His-markiertes PI3K γ kodierten. Zusätzlich wurde ein pCMV-Plasmid mit dem Fusionsgen für N-terminal TAP-markiertes p101 erzeugt. Alle Fusionsgene standen unter der Kontrolle eines konstitutiven pCMV-Promotors.

4.1.2 Synthese der Fusionsproteine in Säugerzellen

Die Erzeugung stabiler Zelllinien war die Voraussetzung, um genügend Zellmaterial zu amplifizieren und somit das Epitop-markierte Protein in quantitativen Mengen reinigen zu können. Dazu wurden zwei verschiedene Säugerzelllinien verwendet. RBL2H3-Zellen, welche PI3K γ produzieren und HEK293-Zellen, die PI3K γ endogen nicht bilden. RBL steht für rat basophilic leukemia und ist eine Zelllinie, die als Modellsystem für humane Mastzellen verwendet wird. Es wurde gezeigt, dass PI3K γ in Mastzellen in unterschiedliche Signaltransduktionsprozesse eingebunden ist (Laffargue et al., 2002; Wymann et al., 2003), was den Nachweis potentieller Interaktionspartner ermöglichen sollte. Zwar fehlt in HEK293-Zellen, einer humanen Nierenzelllinie, die physiologische Voraussetzung zur Komplexbildung mit PI3K γ , doch kann so die Konkurrenz zwischen endogenem und ektopisch synthetisiertem Protein um potentielle Bindungspartner in der Zelle ausgeschlossen werden.

Beide Zelltypen wurden mit den unter 4.4.1 erstellten Plasmiden transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen unter Selektionsdruck (1 mg/ml Geneticin) für 4 - 5 Tage kultiviert und anschließend die Synthese der TAP-Epitop-markierten Proteine immunologisch im Western Blot überprüft. In allen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Plasmide erfolgreich in die

Zellen transfiziert und die entsprechenden TAP-Fusionsproteine produziert wurden. Als Molekulargewichtskontrolle für PI3K γ -Fusionsproteine wurde gereinigtes His-markiertes PI3K γ mit einem Molekulargewicht von 120 kDa verwendet. Für das TAP-Epitop wurde ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa kalkuliert. Damit ergab sich ein Molekulargewicht der TAP-PI3K γ -Fusionsproteine von 140 kDa. Abb. 4.2 zeigt am Beispiel von PI3K γ -TAP die zu erwartende Größendifferenz zwischen His-PI3K γ und PI3K γ -TAP von 20 kDa. Die Funktionalität der synthetisierten Fusionsproteine wurde im Lipidkinase-Assay bestätigt (nicht gezeigte Daten).

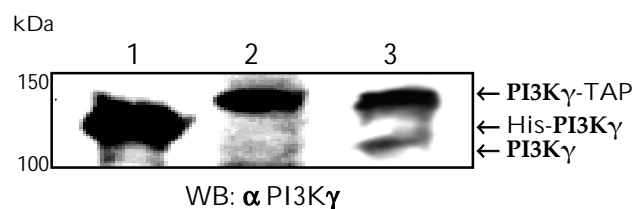


Abb. 4.2: Synthese TAP-markierter PI3K γ -Fusionsproteine im eukaryotischen Zellsystem
HEK293- bzw. RBL2H3-Zellen wurden mit dem Plasmid pCDNA3-PI3K γ -TAP und in Gegenwart von 1mg/ml Geneticin kultiviert. RBL2H3-Zelllysate (Spur 2), HEK293-Zelllysate (Spur 3) und HIS-PI3K γ (Spur 1) wurde im 7,5-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die PI3K γ -Proteine wurden im WB mit dem spezifischen PI3K γ -B4-AK detektiert.

4.1.3 Synthese der Fusionsproteine in stabilen Zelllinien

Die transfizierten Zellen wurden wie unter 3.2.3 beschrieben, zur Erzeugung stabiler Zelllinien weitergeführt. Um die stabile Synthese der TAP-Epitop-markierten Proteine zu verfolgen, wurde nach Passagierung der Zellen die Produktion der Fusionsproteine immunologisch im Western Blot untersucht (Abb. 4.3).

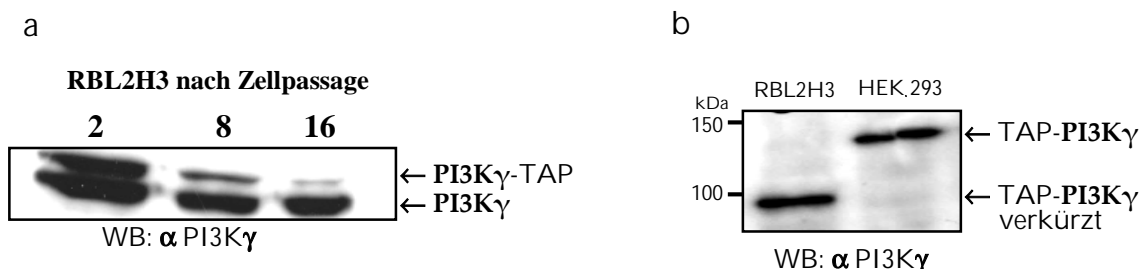


Abb. 4.3: Veränderung der Synthese von PI3K γ -Fusionsproteinen in stabil transfizierten RBL2H3-Zellen
Aliquote von RBL2H3-Zellklonen, die PI3K γ -TAP stabil synthetisieren oder RBL2H3- bzw. HEK293-Zellklone, die stabil TAP-PI3K γ synthetisierte, wurden nach 2, 8 oder 10 Zellpassagen (a) bzw. ca. 5 Zellpassagen (b) lysiert. Die Proben wurden im 7,5-%igen SDS- PAA-Gel getrennt auf PVDF-Membranen transferiert und die PI3K γ -Peptide im WB mit PI3K γ -B4-AK immunologisch nachgewiesen.

Dabei wurde festgestellt, dass es insbesondere bei transfizierten RBL2H3-Zellen zu Veränderungen in der Synthese der TAP-Fusionsproteine kam. Während PI3K γ -TAP-synthetisierende Zellen eine sukzessive Verringerung der Synthese zeigten (Abb. 4.3 a), wurde bei Zellen, die TAP-PI3K γ synthetisierten, eine Verkürzungen des Proteins beobachtet (Abb. 4.3 b). In HEK293-Zellen wurde das korrekte Fusionsprotein stabil synthetisiert (Abb. 4.3 b).

4.1.4 Induzierbare Expression von TAP-PI3K γ

Der Verlust von funktionellem, TAP-Epitop-markiertem PI3K γ in allen stabil transfizierten RBL2H3-Zellklonen lässt vermuten, dass sich die Überexpression von PI3K γ nachteilig auf die Zellen ausgewirkt hat. Ein potentieller Wachstumsvorteil hat offenbar zur Anreicherung von Zellen geführt, welche das eingebrachte Fusionsprotein nicht mehr oder aber in verkürzter Version bildeten. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein RBL2H3-Zellklon erzeugt, in dem die Synthese von TAP-PI3K γ reprimiert werden kann. Hierfür wurde ein reprimierbares Vektorsystem pNRTIS21 (Kumar, unveröffentlicht) verwendet. In diesem System unterdrückt ein reprimierbarer Promotor die Synthese des Fusionsproteins solange die Zellen in Gegenwart von Tetracyclin (TC) kultiviert werden.

RBL2H3-Zellen wurden mit dem Plasmid pNRTIS21-TAP-PI3K γ stabil transfiziert und in Gegenwart von 200 ng/ml TC amplifiziert. Zur Induktion der Expression von TAP-PI3K γ wurden die Zellen anschließend in Abwesenheit von TC kultiviert. Um die regulierbare Synthese des Fusionsproteins zu überprüfen, wurden Aliquote der Zellen während beider Kultivierungsphasen lysiert. Mittels Western Blot wurde die Präsenz von PI3K γ -TAP in den Zelllysaten immunologisch analysiert (Abb. 4.4).



Abb. 4.4: Regulierung der Synthese von TAP-PI3K γ in RBL2H3-Zellen

RBL2H3-Zellen wurden stabil mit dem Plasmid pNRTIS-TAP-pPI3K γ transfiziert und für 4 Tage in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von 200 ng/ml TC amplifiziert. Aliquote der Zellen wurde lysiert, im 7,5-%igen SDS-PAA-Gel getrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. TAP-PI3K γ wurde im WB mit PI3K γ -B4-AK detektiert.

Nur in Zellen, die in Abwesenheit von TC kultiviert wurden, konnte TAP-PI3K γ nachgewiesen werden. Das belegt eindeutig die Induzierbarkeit der Bildung des Fusionsproteins.

4.1.5 Reinigung TAP-Epitop-markierter Fusionsproteine

Zellen, die nachweislich die TAP-Epitop-markierten Fusionsproteine synthetisierten, wurden zur Etablierung der Tandem Affinity Purification genutzt. Um Kenntnis über die Effizienz der Reinigung zu erhalten, wurden Proben vor und nach den einzelnen Reinigungsschritten entnommen. Im Western Blot wurde die Präsenz des Fusionsproteins quantitativ verfolgt (Abb. 4.5). Zuerst erfolgte die Bindung des TAP-Fusionsproteins an IgG-Agarose. Hier wurde fast die gesamte Menge der TAP-Epitop-markierten Proteine aus dem Zelllysat isoliert (Abb. 4.5 Spuren 2 - 4). Im zweiten Schritt wurden die TAP-Fusionsproteine durch Abspaltung des Protein-A-Epitops mittels TEV-Protease von der IgG-Agarose eluiert. Unabhängig von der N- oder C-terminalen Lokalisierung des TAP-Epitops konnten jeweils nur ca. 50 % aller TAP-Peptide in Lösung gebracht werden (Abb. 4.5 Spuren 5). Auch der Einsatz hochkonzentrierter TEV-Protease oder die Vervielfachung der Reaktionszeit bewirkten keine Steigerung der Spaltungseffizienz. Daher muss davon ausgegangen werden, dass durch eine ungünstige Konformation im Bereich des Epitops der TEV-Spaltort für die Protease schwer zugänglich war und dadurch die Spaltung eingeschränkt wurde. Die nachfolgende Bindung des gespaltenen Materials an Calmodulin-Sepharose erfolgte in allen Fällen effizient.

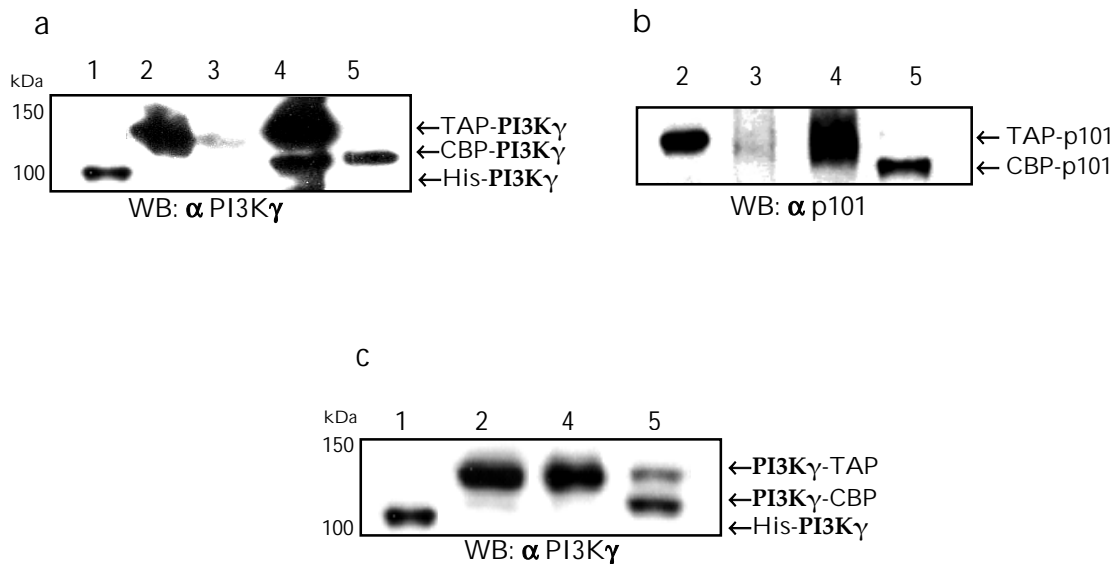


Abb. 4.5: Tandem Affinity Purification von TAP-Epitop-markiertem PI3Kγ bzw. p101

Je 8×10^6 RBL2H3-Zellen, die TAP-PI3Kγ (a) oder TAP-p101 (b) bzw. HEK293-Zellen, die PI3Kγ-TAP (c) synthetisierten, wurden lysiert. Die Fusionsproteine wurden über Tandem Affinity Purification isoliert. Zur Kontrolle der Reinigungsschritte wurden Proben des Gesamtzelllysates vor (Spuren 2) und nach der Bindung an IgG-Agarose (Spuren 3), der IgG-Agarose vor der TEV-Spaltung (Spuren 4) und der Calmodulin-Sepharose nach Bindung des Fusionsproteins (Spuren 5) im 7,5-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen wurden die PI3Kγ-Peptide mit dem PI3Kγ-B4-AK im WB immunologisch nachgewiesen. Zur Molekulargewichtskontrolle wurde gereinigtes His-PI3Kγ (Spuren 1) verwendet.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob sich mittels Tandem Affinity Purification natürliche PI3K γ -assoziierte Proteinkomplexe aufreinigen lassen. Aus mit dem pcDNA3-TAP-p101-Plasmid transfizierten RBL2H3-Zellen, wurde TAP-p101 über die Bindung an IgG-Agarose isoliert. Das gereinigte Material wurde im SDS-PAA-Gel separiert und im Western Blot isoliertes TAP-p101 und co-gereinigtes PI3K γ immunologisch detektiert (Abb. 4.6). Eine unspezifische Bindung von PI3K γ an IgG-Agarose wurde über eine Negativkontrolle ausgeschlossen, bei der Zelllysate nicht transfizierter RBL2H3-Zellen verwendet wurde.

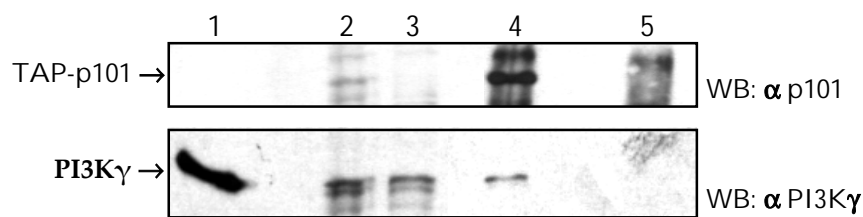


Abb. 4.6: Co-Reinigung von PI3K γ über p101

RBL2H3-Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA3-TAP-p101 transfiziert, lysiert und TAP-p101 über Bindung an IgG-Agarose immobilisiert. Aliquote vom Gesamtzelllysate (Spur 2), Zelllysate nach IgG-Reinigung (Spur 3) und IgG-Agarose nach Bindung von TAP-p101 (Spur 4) wurden im 7,5-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. TAP-p101 und co-gereinigtes PI3K γ wurden im WB mit p101-11-AK bzw. PI3K γ -B4-AK detektiert. Als Negativkontrolle (Spur 5) wurde bei gleichem experimentellem Ablauf Zelllysate nicht transfizierter RBL2H3-Zellen eingesetzt. Als Molekulargewichtskontrolle diente gereinigtes His-PI3K γ (Spur 1).

Über die Isolierung von TAP-p101 konnte PI3K γ co-gereinigt werden. Damit wurde gezeigt, dass es grundsätzlich möglich ist, Bindungspartner, die unter physiologischen Bedingungen mit den TAP-Epitop-markierten Köderproteinen assoziieren, zu isolieren. Nahezu die gesamte Menge des transfizierten Adapterproteins p101 konnte aus dem Zelllysate gereinigt werden (Abb. 4.6: Vergleich Spur 2 mit Spur 3, oberer Teil). Jedoch war die Menge an co-gereinigter PI3K γ , die im Western Blot detektiert wurde, sehr gering. Möglicherweise kam es aufgrund der Überexpression nicht zum Bindungsverhältnis 1:1 zwischen beiden Proteinen. Bei unbekannten Interaktionspartnern, die nur im Rahmen der Signalweiterleitung mit PI3K γ interagieren, ist ein dynamischer Prozess zu erwarten, in dem zu einem definierten Zeitpunkt nur ein geringer Prozentsatz der Signalproteine im direkten Kontakt zu Bindungspartnern steht. Aus diesem Grund ist es wichtig, das Zielprotein quantitativ aus den Zellextrakten zu isolieren. Bei unbekannten Bindungspartnern ist darüber hinaus eine immunologische Charakterisierung im Western Blot nicht möglich. Die Proteine können nur über weniger sensitive Methoden wie Silberfärbung oder Comassiefärbung sichtbar gemacht werden. Das setzt eine Grundkonzentration co-gereinigter Interaktionspartner voraus, die nach den hier gemachten Erfahrungen durch die Tandem Affinity Purification von PI3K γ oder p101 nicht gewährleistet werden kann.

In einem weiteren Ansatz wurden RBL2H3-Zellen mit dem pcDNA3-PI3K γ -Flag-His-Plasmid transient transfiziert, das für PI3K γ -Flag-His kodierte. Auch dieses duale Epitop ermöglicht zwei voneinander unabhängige Reinigungsschritte. Jedoch wurde auch durch die Zweischrittreinigung von PI3K γ -Flag-His keine deutliche Verbesserung in der Reinigungseffizienz von PI3K γ im Vergleich zur Tandem Affinity Purification erreicht (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass N- oder C-terminal lokalisierte Epitope an PI3K γ sterisch schlecht zugänglich sind, wodurch Reinigungsschritte behindert werden. Neben der Instabilität der Synthese von Epitop-markiertem PI3K γ war dies der zweite Grund, warum eine effiziente Reinigung der markierten Proteine in quantitativen Mengen nicht möglich war.

4.2 Isolierung PI3K γ -assoziierter Komplexe mittels Immunopräzipitation

Da es nicht gelungen war, über die Aufreinigung von Epitop-markiertem PI3K γ ausreichend Material für nachfolgende massenspektrometrische Analysen zu erhalten, wurde eine alternative Reinigungsmethode, die Immunopräzipitation, angewandt. Durch diese Methode kann endogen synthetisiertes Köderprotein und Bindungspartner isoliert werden. Das ermöglicht die Untersuchung potentieller PI3K γ -Protein-Komplexe im Bereich des natürlichen Expressionsniveaus und im physiologischen Zustand der Zellen.

Für erste Experimente zur Anwendung und Optimierung der Immunopräzipitation wurden RBL2H3-Zellen ausgewählt. Vorversuche ergaben, dass aus ca. $8 - 9 \times 10^7$ Zellen ausreichend endogenes PI3K γ für massenspektrometrische Untersuchungen aufgereinigt werden kann. Für die Immunopräzipitation von PI3K γ wurde standardgemäß der monoklonale PI3K γ -Antikörper 641 eingesetzt. Um die bestmögliche Erkennung des endogenen Proteins durch den Antikörper zu erzielen, wurde das Zelllysate zunächst nur in Gegenwart des Antikörpers inkubiert, bevor im zweiten Inkubationsschritt GammaBind-Sepharose zugegeben wurde, um den Antikörper-Protein-Komplex zu immobilisieren. Danach wurde das gebundene Material gewaschen, in Probenpuffer aufgenommen und im SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Gereinigtes PI3K γ und co-gereinigte Proteine wurden im PAA-Gel über Silberfärbung visualisiert (Abb. 4.7 Spur 3). Um spezifisch gebundene Interaktionspartner von unspezifisch gebundenen Proteinen zu unterscheiden, wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Dazu wurde in einem identischen Ansatz, der PI3K γ -spezifische Antikörper durch eine Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG2a) ersetzt. Proteine die unspezifisch an den Antikörper oder die Sepharose binden, konnten so identifiziert und selektiert werden (Abb. 4.7 Spur 4).

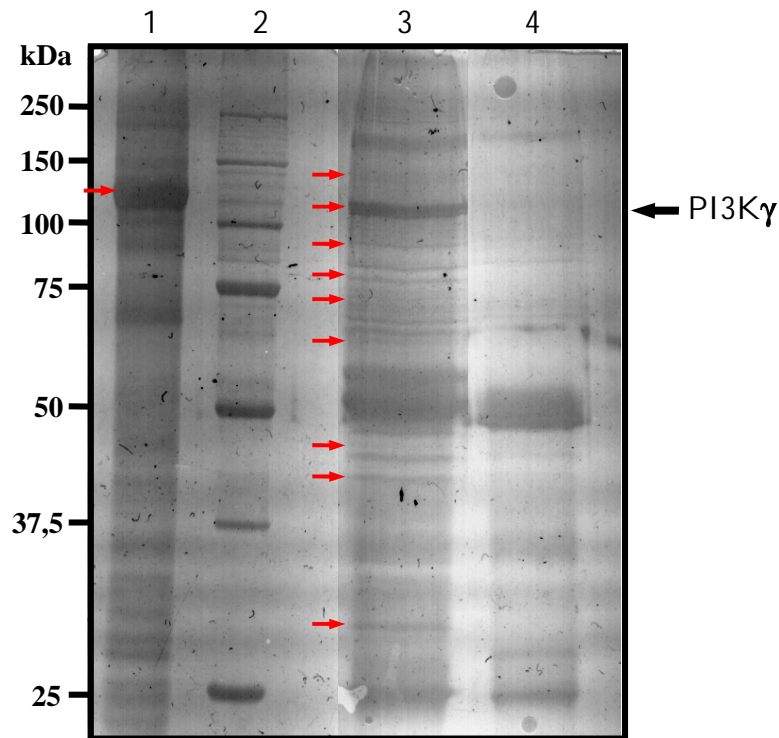


Abb. 4.7: Isolierung PI3K γ -assoziierter Proteinkomplexe über Immunopräzipitation

8 x 10⁷ RBL2H3-Zellen wurden in 5 ml Lysepuffer lysiert und PI3K γ über IP gereinigt. Das isolierte Material (Spur 3) wurde zusammen mit gereinigtem His-PI3K γ zur Kontrolle isolierter PI3K γ (Spur 1), einem Molekulargewichtsstandard (Spur 2) und der Negativkontrolle (Spur 4) im 10-%igen PAA-Gel über SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Nachfolgend wurden die Proteine über Silberfärbung sichtbar gemacht. Proteinbanden, die für massenspektrometrische Analysen weiterverarbeitet wurden, sind gekennzeichnet (→).

Im Vergleich zur Negativkontrolle wurden alle Proteinbanden aus dem PAA-Gel ausgeschnitten, welche ausschließlich in der PI3K γ -Immunopräzipitation nachweisbar waren. Anschließend erfolgte die Fragmentierung der Proteine in einzelne Peptide durch proteolytische Trypsin-Spaltung im Gel (s. 3.3.10.1). Die erhaltenen Peptide wurden massenspektrometrisch analysiert und die Massenspektren der einzelnen Proben wurden mit Hilfe der SeQuest-Analyse-Software ausgewertet. Die Peptide aus der Positivkontrolle (Abb. 4.7, Spur 1) konnten eindeutig dem Zielprotein PI3K γ zugeordnet werden. Auch im Immunopräzipitationsansatz wurden mehr als 50 PI3K γ -Peptide identifiziert, womit die erfolgreiche Durchführung des Experimentes bewiesen wurde. Darüber hinaus wurden mehrere Peptide potentiellen Assoziationspartnern von PI3K γ zugewiesen. In Tab. 4.1 ist eine Auswahl von Proteinen angeführt, denen mindestens 3 verschiedene Peptide in den dem Molekulargewicht entsprechenden Proteinbanden zugewiesen werden konnten.

Protein	Anzahl identifizierter Peptide	Molekulargewicht in kDa
PLC γ 1	3	148
SHIP2	6	140
diacylglycerol kinase ι -1	6	115
similar to TNF receptor associated factor 4	3	53
Src-like adapter protein-2	3	31

Tab. 4.1 Auswahl co-gereinigter, massenspektrometrisch ermittelter Proteine

Die in Abb. 4.7 markierten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und die Proteine im Gel proteolytisch gespalten. Die Proben wurden massenspektrometrisch aufgetrennt und einzelne Peptide mittels SeQuest-Analyse-Software identifiziert. Dargestellt sind Proteine denen im Massenspektrum mindestens 3 unterschiedliche Peptide zugeordnet werden konnten und deren Molekulargewicht der aus den PAA-Gel isolierten Proteinbande entsprach.

Um die massenspektrometrisch erhaltenen Daten zu validieren, wurde die immunologische Isolierung von PI3K γ wiederholt. Anschließend erfolgte der Nachweis von co-gereinigtem PLC γ 1 bzw. SHIP2 mit spezifischen Antikörpern im Western Blot. Die Bindung von PLC γ 1 an PI3K γ konnte auf diesem Weg bestätigt werden (Abb. 4.8a). Im Bereich des Molekulargewichtes von SHIP trat im Western Blot eine Kreuzreaktion des SHIP2-Antikörpers mit einem Artefakt des für die Immunopräzipitation verwendeten PI3K γ -Antikörpers 641 auf. Somit war kein spezifischer Nachweis von co-gereinigtem SHIP2 möglich. Im alternativ durchgeführten GST-Pull-Down-Assay wurde 0,5 μ g rekombinantes GST-PI3K γ mit RBL2H3-Zellextrakt inkubiert und GST-PI3K γ danach über Bindung an GT-Sepharose immobilisiert. Im Western Blot wurde die Bindung von SHIP2 an GST-PI3K γ immunologisch untersucht (Abb. 4.8b). SHIP2 wurde im GST-Pull-Down nicht nachgewiesen. Folglich wurde die Wechselwirkung zwischen PI3K γ und SHIP2 nicht bestätigt.

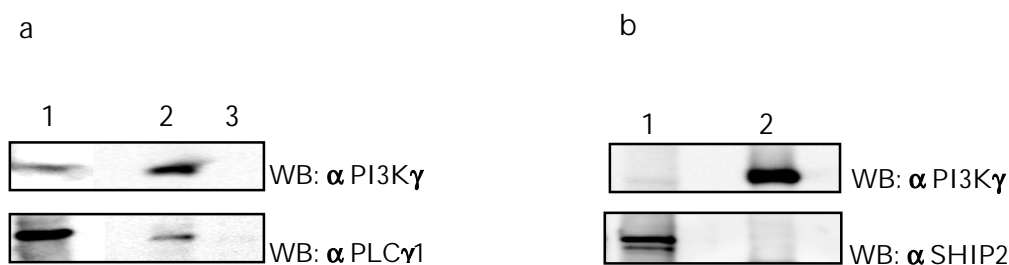


Abb. 4.8: Immunologische Validierung der Interaktion von PI3K γ mit PLC γ 1 bzw. SHIP2

Das Zelllysat von ca. 8×10^6 RBL2H3-Zellen wurde entweder zur standardgemäßen Reinigung von PI3K γ mittels IP (a) oder für die Inkubation mit rekombinantem GST-PI3K γ (b) verwendet. GST-PI3K γ wurde dann mittels GT-Sepharose immobilisiert und gewaschen. Isoliertes PI3K γ bzw. GST-PI3K γ (Spuren 2) wurden mit einem Aliquot des Gesamtzelllysates (Spuren 1) und gegebenenfalls einer AK-Isotyp-Kontrolle als Negativkontrolle (Spur 3) im 7,5-%igen SDS-PAA-Gel separiert und auf PVDF-Membranen transferiert. Im WB wurde GST-PI3K γ bzw. PI3K γ mit PI3K γ -B4-AK, PLC γ 1 mit PLC γ 1-AK und SHIP2 mit SHIP2-AK immunologisch charakterisiert.

4.2.1 PKC-Isoformen als Interaktionspartner von PI3K γ

Parallel zu dieser Arbeit konnten im Institut für molekulare Zellbiologie, Jena von I. Kitanovic durch Immunopräzipitation von PI3K γ PKC-Isoformen (PKC α , β I und β II) als potentielle Interaktionspartner von PI3K γ in Jurkat-Zellen (T-Zell-Zelllinie) identifiziert werden (unveröffentlichte Daten).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde PI3K γ aus RBL2H3-Zelllysaten immunologisch gereinigt, die Proben im SDS-PAA-Gel aufgetrennt und im Western Blot auf co-gereinigte PKC-Isoformen untersucht. Dafür wurden spezifische Antikörper gegen PKC α und PKC β I eingesetzt. Die Assoziation zwischen PI3K γ und PKC α wurde somit nicht nur in Jurkat-Zellen sondern auch in RBL2H3-Zellen nachgewiesen (Abb. 4.9). Dagegen wurde die in Jurkat-Zellen gezeigte Interaktion von PI3K γ mit PKC β in RBL2H3-Zellen nicht bestätigt. Durch die Verwendung der Negativkontrolle wurden unspezifische Bindungen ausgeschlossen (Abb. 4.9, Spuren 3).

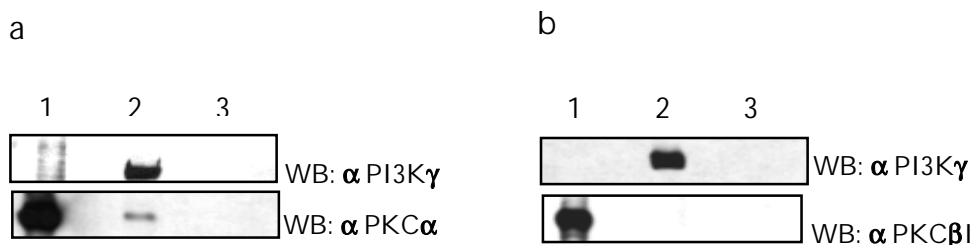


Abb. 4.9: Interaktion zwischen PI3K γ und PKC-Isoformen in RBL2H3-Zellen

Jeweils $6-8 \times 10^6$ RBL2H3-Zellen wurden lysiert und PI3K γ über IP aus dem Zelllysate isoliert. Die PI3K γ -IPs (Spuren 2) wurde zusammen mit einem Aliquot des Gesamtzelllysates (Spuren 1), zum Nachweis endogener Proteine, und der Negativkontrolle (Spuren 3) im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Im WB wurde gereinigtes PI3K γ und co-gereinigtes PKC α (a) oder PKC β I (b) mit PI3K γ -B4- bzw. polyklonalen PKC α - und PKC β I-AK detektiert.

Um die PI3K γ -PKC α -Wechselwirkung weiter zu validieren, sollte die wechselseitige Co-Reinigung beider Bindungspartner gezeigt werden. So sollte über die Isolierung von PKC α , PI3K γ aus dem Zelllysate co-gereinigt werden. Dieser Nachweis wurde mit HEK293-Zellen, die stabil die Wildtypvariante von PI3K γ synthetisieren, durchgeführt. PKC α wurde mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper aus dem HEK293-Zelllysate angereichert und die Proteine im SDS-PAA-Gel separiert. Die immunologische Analyse von gereinigtem PKC α und PI3K γ im Western Blot ist in Abb. 4.10 dargestellt.

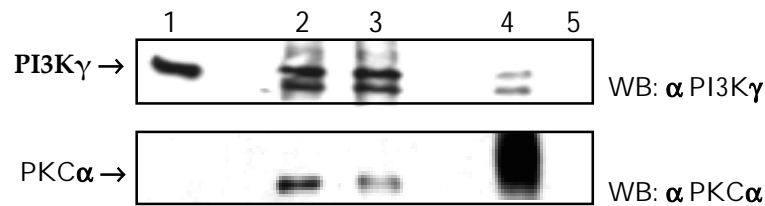


Abb. 4.10: Co-Reinigung von PI3K γ über PKC α -IP

6 x10⁶ HEK293-Wt-PI3K γ Zellen wurden lysiert und PKC α über IP mit einem monoklonalem AK aus dem Zelllysate angereichert. Die PKC α -IP (Spur 4), ein Aliquot des Gesamtzelllysates vor (Spur 2) bzw. nach der Reinigung (Spur 3) und die AK-Isotyp-Kontrolle (Spur 5) wurden im 10-%igen SDS-PAA-Gel separiert und auf PVDF-Membran transferiert. Im WB erfolgte die Detektion von PKC α und PI3K γ mit polyklonalem PKC α - und dem PI3K γ -B4-AK. Als Molekulargewichtskontrolle für PI3K γ wurde gereinigtes His-PI3K γ (Spur 1) verwendet

Eine Co-Reinigung beider Proteine konnte eindeutig nachgewiesen werden. Dabei wurde für PI3K γ sowohl im Zelllysate als auch in der Immunopräzipitation von PKC α eine Doppelbande detektiert. Es ist möglich, dass im Laufe der Kultivierung im Gen, welches für das Fusionsprotein kodiert, eine Mutation auftrat, die zur Synthese eines verkürzten PI3K γ -Peptids führte. Es ist denkbar, dass es zur Bildung einer Mischpopulation gekommen ist, bestehend aus Zellen, die die Wildtypform von PI3K γ bildeten und Zellen die eine verkürzte Form von PI3K γ synthetisierten. Die potentiell verkürzte PI3K γ -Variante war in ihrer Bindung zu PKC α nicht beeinträchtigt und wurde mittels PKC α -Immunopräzipitation ebenfalls co-gereinigt.

Parallel dazu wurde versucht, aus RBL2H3-Zellen endogenes PI3K γ über die PKC α -Isolierung zu co-reinigen. Hier wurde keine PI3K γ co-gereinigt. Aufgrund der Abundanz von PKC α im Zelllysate, wurde PKC α aus den Zelllysaten nur unvollständig immunopräzipitiert (Abb. 4.10, vergl. Spur 2 und 3). Soweit nur ein geringer Teil von PKC α mit PI3K γ komplexiert vorlag, befand sich möglicherweise die Menge co-gereinigter PI3K γ im Western Blot unter der Detektionsgrenze. Diese Hypothese sollte im folgenden Experiment überprüft werden.

4.2.2 Untersuchung zum Komplexformation von PI3K γ und PKC α

Eine Methode um Proteinkomplexe darzustellen, ist deren Auftrennung in der Blue Native Gelelektrophorese (BN-PAGE). Dazu werden Proteine in der ersten Dimension unter nativen Bedingungen separiert, wobei natürliche Proteinkomplexe erhalten bleiben. In der darauf folgenden zweiten Dimension werden die Proteine dann unter denaturierenden Bedingungen so aufgetrennt, dass Proteine des gleichen Komplexes horizontal in einer Linie detektiert werden können. Gleichzeitig kann über diese Methode belegt werden, welcher Anteil der Gesamtproteinmenge in der Zelle in Proteinkomplexe eingebunden ist.

Zur Validierung unserer bisherigen Befunde wurde die PI3K γ - oder PKC α -Komplexbildung, mittels BN-PAGE charakterisiert. Die Verteilung von PI3K γ oder PKC α nach der Auftrennung in der ersten Dimension ist in Abb. 4.11a und nach der Separierung in der zweiten Dimension in Abb. 4.11b und c dargestellt.

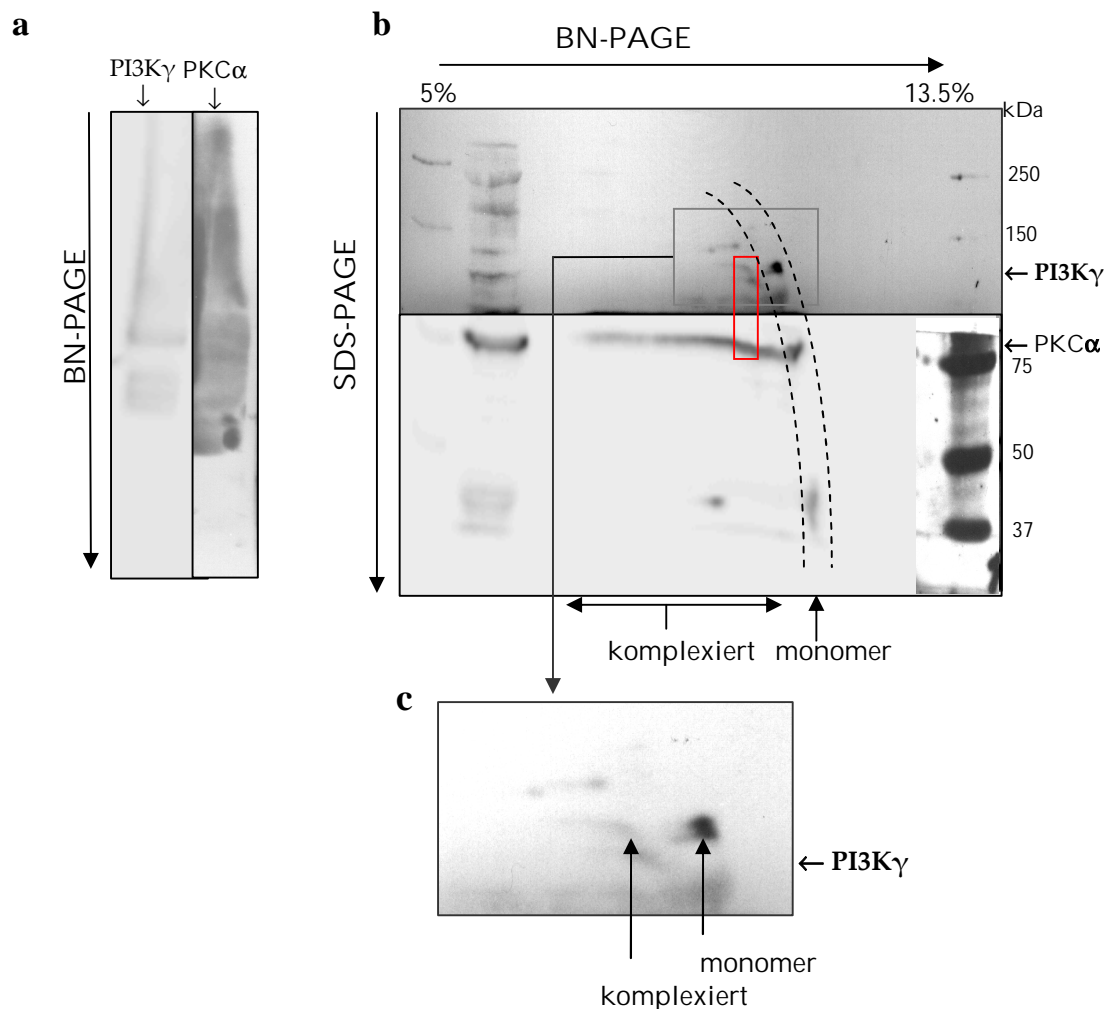


Abb. 4.11: Untersuchung zur Komplexbildung von PI3K γ und PKC α unter Verwendung der BN-PAGE. 8 x 10⁶ RBL2H3-Zellen wurden lysiert, das Lysat in 3 Aliquots aufgeteilt und die Proteine in der ersten Dimension (BN-PAGE) nativ aufgetrennt. 2 Spuren des BN-PAGE-Gels wurden direkt zum Proteintransfer auf eine PVDF-Membran genutzt (a). Die 3. Spur des BN-PAGE-Gels wurde horizontal gedreht in der zweiten Dimension unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (b) und die Proteine ebenfalls auf eine PVDF-Membran transferiert. Im WB wurde die Verteilung von PI3K γ und PKC α mit PI3K γ -B4- bzw. PKC α -AK charakterisiert. Nach der zweiten Dimension ist der Laufbereich monomerer Proteine durch Strichlinien markiert. Der Laufbereich komplexierter Proteine befindet sich links davon. Der Bereich, in dem sich PI3K γ und PKC α in einem Proteinkomplex von gleichem Molekulargewicht befinden, ist rot eingekreist. Rechts ist der Molekulargewichtsstandard in kDa dargestellt. Die Verteilung von monomerem und komplexiertem PI3K γ wurde zur besseren Ansicht vergrößert dargestellt (c).

Der in Abb. 4.11b eingekreiste Sektor (- -) gibt den Laufbereich monomerer Proteine wieder. Alle Signale links davon zeigen komplexierte Proteine. In Abb. 4.11c ist die Detektion von PI3K γ

vergrößert hervorgehoben. Die jeweiligen Signalintensitäten im Western Blot wurden quantifiziert und das Verhältnis der Menge an komplexierten Proteinen im Vergleich zur jeweiligen Gesamtmenge im Zelllysate bestimmt. Dabei wurde ermittelt, dass nur 16 % der Gesamtmenge von PI3K γ in der Zelle in Komplexe eingebunden waren, während 85 % der PKC α -Moleküle nicht als Monomere vorlagen (Abb. 4.11b, unterer Teil). Beim Vergleich der Lokalisierung von PI3K γ und PKC α in Abb. 4.11b (rot eingerahmt), konnte komplexiertes PI3K γ und PKC α im Bereich eines Proteinkomplexes mit gleichem Molekulargewicht nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beide Proteine in einem Komplex vorliegen, was unseren Befund einer Wechselwirkung weiter bestätigt.

4.2.3 PI3K γ -PKC α -Interaktion in neutrophilen Granulozyten

Nachdem Vorversuche in immortalisierten Zelllinien PKC α und PLC γ als neue Interaktionspartner von PI3K γ auswiesen, sollten die Untersuchungen in primären Zellen fortgeführt und die Ergebnisse im natürlichen physiologischen System überprüft werden. Für diese Untersuchungen wurden neutrophile Granulozyten gewählt. Wie unter 1.3.3 beschrieben, agiert PI3K γ in neutrophilen Granulozyten als Regulator zellulärer Prozesse, die essentiell für die Abwehr invasiver Mikroorganismen sind. Dazu zählen Migration und Induktion der ROS-Produktion (Hannigan et al., 2004). Bis heute ist das Wissen über die molekulare Wirkungsweise von PI3K γ in diesen Signalwegen noch lückenhaft. Aus diesem Grund sollte die Identifizierung und funktionelle Analyse von PI3K γ -Bindungspartnern zum besseren Verständnis der PI3K γ -abhängigen Signalkaskaden beitragen. Zur Validierung der in RBL2H3-Zellen nachgewiesenen Interaktionen wurden neutrophile Granulozyten aus peripherem, humanem Vollblut isoliert und die Komplexbildung von PI3K γ mit PLC γ und PKC α mittels PI3K γ -Immunopräzipitation analysiert (Abb. 4.12).

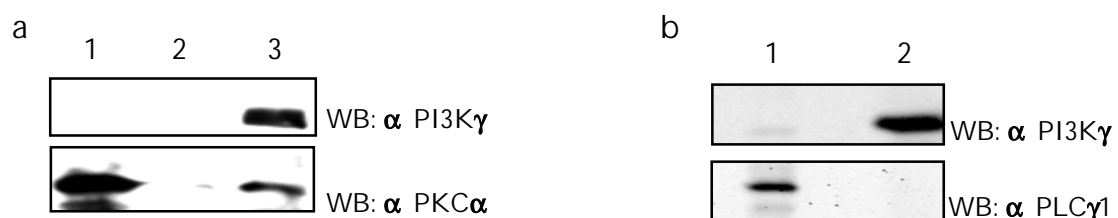


Abb. 4.12: Interaktion von PI3K γ mit PKC α bzw. PLC γ 1 in neutrophilen Granulozyten

4×10^7 neutrophile Granulozyten wurden aus 60 ml humanem, peripherem Blut isoliert und lysiert. PI3K γ wurde über IP aus dem Zelllysate angereichert. Die PI3K γ -IPs (Spur 2) wurden mit einem Aliquot des Gesamtzelllysates (Spur 1) und der Negativkontrolle (Spur 3) im 7,5-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Im WB erfolgte die Detektion von PI3K γ und co-gereinigtem PKC α mit PI3K γ -B4- bzw. PKC α -AK.

Die PKC α -PI3K γ -Interaktion konnte in diesem Zelltyp bestätigt werden. Eine Wechselwirkung mit PLC γ wurde nicht nachgewiesen. Das kann verschiedene Ursachen haben. Es ist möglich, dass die PLC γ -PI3K γ -Interaktion Zelltyp-spezifisch ist oder in unstimulierten neutrophilen Granulozyten nicht auftritt.

4.3 Charakterisierung der PI3K γ -PKC α -Interaktion

Die bisher in vivo nachgewiesene Wechselwirkung zwischen PI3K γ und PKC α wurde in enger Zusammenarbeit mit P. Scroblin durch in vitro-Interaktionsstudien und den Einsatz genetisch veränderter Varianten von PI3K γ und PKC α genauer charakterisiert.

4.3.1 Untersuchung der PI3K γ -PKC α -Interaktion in vitro

Um zu überprüfen, ob PKC α direkt mit PI3K γ interagiert oder die Bindung in vivo über dritte Bindungspartner vermittelt wird, sollte die Wechselwirkung in vitro mit gereinigten, rekombinanten PI3K γ - und PKC α -Proteinen untersucht werden. Dafür wurden Sf-9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren infiziert, welche die genetische Information zur Expression der humanen Fusionsproteine His-PI3K γ und GST-PKC α enthielten. Die infizierten Zellen wurden über 72 h kultiviert und danach lysiert. His-PI3K γ bzw. GST-PKC α -Fusionsproteine wurden über das jeweilige Epitop entsprechend der Angaben in Abschnitt 3.3.4.3 und 3.3.4.4 aus dem Zelllysat gereinigt. Im anschließenden GST-Pull-Down-Assay wurden gleiche Mengen beider Proteine in Abwesenheit oder Gegenwart von 100 nM Wortmannin (WM) bzw. Bisindolylmaleimid (BIM) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde GST-PKC α durch Bindung an Glutathion-Sephadex immobilisiert und mehrmals gewaschen. Die Proben wurden im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und im Western Blot PKC α bzw. PI3K γ immunologisch analysiert. Die erfolgreiche Co-Reinigung von PI3K γ über PKC α ist in Abb. 4.13 dargestellt.

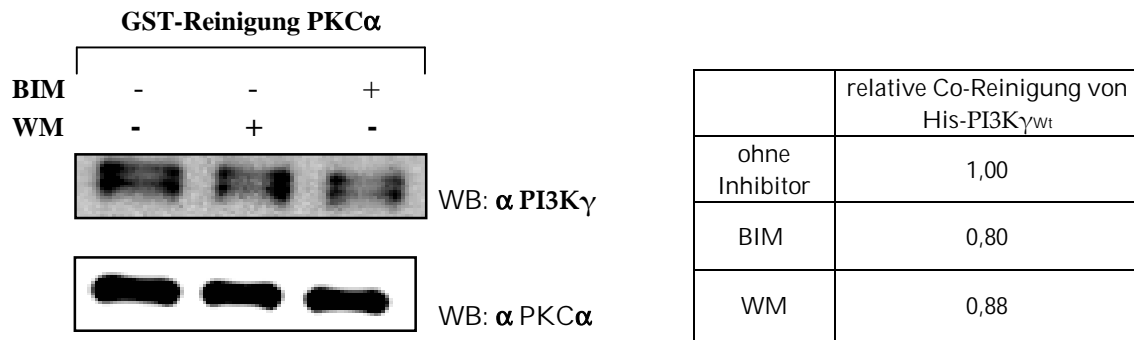


Abb. 4.13: Wechselwirkung zwischen PI3K γ und PKC α in vitro

Je 0,45 μ g gereinigtes His-PI3K γ und GST-PKC α wurden für 10 min bei 37 °C allein oder in Gegenwart von 100 nM BIM bzw. WM inkubiert. GST-PKC α wurde mit Hilfe von GT-Sepharose immobilisiert und 3x gewaschen. Die Proben wurden im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Im WB erfolgte die Detektion von GST-PKC α und His-PI3K γ standardgemäß mit PI3K γ -B4- bzw. PKC α -AK. Um die relative Co-Reinigung zu ermitteln, wurde jeweils die Signalintensität des co-gereinigten durch die des affinitätsgereinigten Proteins geteilt und ins Verhältnis gesetzt.

Auf diese Weise konnte eine direkte Bindung zwischen PI3K γ und PKC α eindeutig bewiesen werden. Die Inhibition der Kinaseaktivität von PKC α und PI3K γ durch BIM bzw. WM zeigte dabei keine wesentliche Auswirkung auf die Bindung beider Proteine in vitro. Dies lässt darauf schließen, dass die Kinaseaktivität eines der Signalproteine nicht Voraussetzung für die Ausbildung der Wechselwirkung ist und diese nicht beeinflusst.

In einem vergleichbaren, hier nicht dargestellten experimentellen Ansatz, bei dem His-PI3K γ statt GST-PKC α gereinigt wurde, konnte die Co-Reinigung von PKC α nachgewiesen werden. Damit ließen sich in vitro beide Proteine unabhängig von eingesetzten Inhibitoren wechselseitig reinigen.

4.3.2 Protein-Protein-Interaktionsstudien in SF-9-Zellen

Nachdem die direkte Bindung von PKC α an PI3K γ nachgewiesen war, wurde in weiteren Interaktionsstudien die Wechselwirkung genauer charakterisiert. Mit dem Ziel, den für die Assoziation mit PKC α benötigten Bereich von PI3K γ einzugrenzen, wurden die Deletionsmutanten His-PI3K $\gamma_{\Delta KIDO}$ und His-PI3K $\gamma_{\Delta RBD}$ eingesetzt. Bei PI3K $\gamma_{\Delta RBD}$ war die Ras-Bindedomäne (RBD) und bei PI3K $\gamma_{\Delta KIDO}$ im C-terminalen Bereich die gesamte Kinasedomäne (KIDO) deletiert, so dass hier parallel zur Bindungsregion auch die Bedeutung fehlender PI3K γ -Aktivität untersucht werden konnte. Zusätzlich wurde die kinaseinaktive Mutante PI3K γ_{KR} verwendet, bei der Lysin 833 durch Arginin ersetzt ist, wodurch die ATP-Bindung unterbunden ist. Der Einsatz einer konstitutiv aktiven und einer inaktiven Variante von PKC α sollte Aufschluss über eine mögliche Abhängigkeit der Wechselwirkung von der PKC-Aktivität geben. Die konstitutiv aktive PKC α_{CON} besitzt eine Mutation bei der Alanin 25, durch Glutaminsäure ersetzt wurde und infolgedessen die Bindung

zum Pseudosubstrat und somit die Autoinhibition aufgehoben ist. Bei der inaktiven $\text{PKC}\alpha_{\text{IN}}$ ist an Lysin 368 durch Arginin ersetzt, wodurch die Bindung von ATP blockiert wird. In Abb. 4.14 sind die von uns verwendeten $\text{PI3K}\gamma$ - und $\text{PKC}\alpha$ -Varianten schematisch dargestellt.

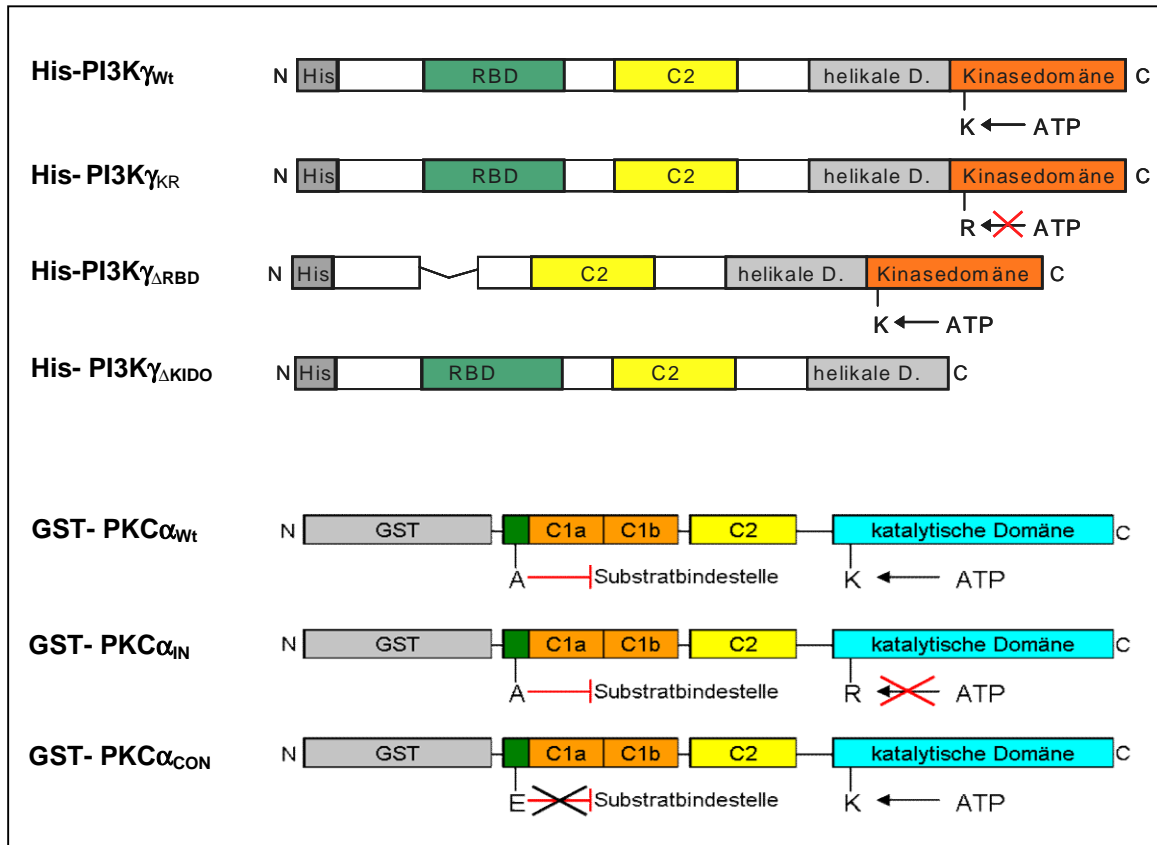


Abb. 4.14: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Varianten von $\text{PI3K}\gamma$ und $\text{PKC}\alpha$.

Bei $\text{His-PI3K}\gamma_{\Delta\text{RBD}}$ und $\text{His-PI3K}\gamma_{\Delta\text{KIDO}}$ wurde die RBD- bzw. Kinasedomäne komplett deletiert. Bei $\text{PI3K}\gamma$ und $\text{PKC}\alpha_{\text{wt}}$ wird die Aminosäure K733 bzw. K368 zur Bindung von ATP benötigt (schwarzer Pfeil). Durch die Mutation K733 \rightarrow R ($\text{His-PI3K}\gamma_{\text{KR}}$) bzw. K368 \rightarrow R ($\text{PKC}\alpha_{\text{IN}}$) wird die ATP-Bindung verhindert (rotes Kreuz). Die Substratbindestelle von $\text{PKC}\alpha_{\text{wt}}$ wird durch das Pseudosubstrat blockiert (roter Pfeil). Durch die Mutation A25 \rightarrow E in $\text{PKC}\alpha_{\text{CON}}$ wird die Autoinhibition durch das Pseudosubstrat aufgehoben (schwarzes Kreuz).

Für Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen den $\text{PI3K}\gamma$ - und $\text{PKC}\alpha$ -Varianten wurden Sf-9-Zellen mit jeweils einer der GST- $\text{PKC}\alpha$ -Varianten und $\text{His-PI3K}\gamma_{\text{wt}}$ bzw. $\text{His-PI3K}\gamma_{\Delta\text{KIDO}}$ co-infiziert oder GST- $\text{PKC}\alpha_{\text{wt}}$ und $\text{His-PI3K}\gamma_{\Delta\text{RBD}}$ co-infiziert. Um eine unspezifische Bindung von $\text{PI3K}\gamma$ an das GST-Epitop der $\text{PKC}\alpha$ -Fusionsproteine oder an GT-Sepharose auszuschließen, wurden als Negativkontrolle Sf-9-Zellen mit Baculoviren, die nur die Information für GST allein enthielten und Baculoviren für $\text{His-PI3K}\gamma_{\text{wt}}$ co-infiziert. Drei Tage nach Infektion wurden die Zellen lysiert und GST bzw. GST- $\text{PKC}\alpha$ aus den Zelllysaten aufgereinigt. Die Reinigungsansätze wurden im 7,5-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und im Western Blot die $\text{PKC}\alpha$ - bzw. co-gereinigten $\text{PI3K}\gamma$ -Peptide und GST analysiert (Abb. 4.15). Sowohl $\text{His-PI3K}\gamma_{\text{wt}}$ als auch $\text{His-PI3K}\gamma_{\Delta\text{KIDO}}$ wurden bei der GST-Immobilisierung aller drei GST- $\text{PKC}\alpha$ -Varianten aus dem Sf-9-Zelllysate co-gereinigt.

In der Negativkontrolle wurde GST sehr effizient aus dem Lysat gereinigt. Es konnte aber keine Co-Reinigung von His-PI3K γ_{wt} festgestellt werden. Damit ist eine unspezifische Bindung von PI3K γ an GST ausgeschlossen.

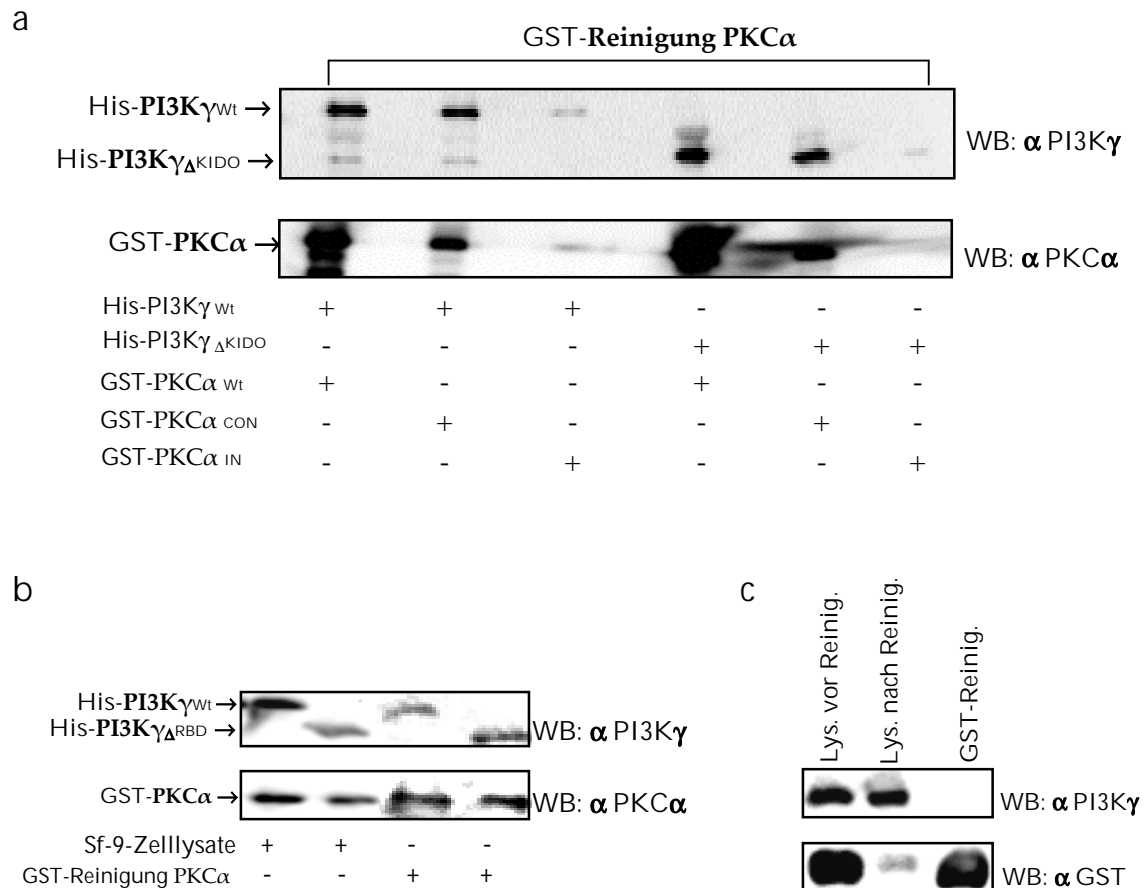


Abb. 4.15: Bindungsstudien zur Interaktion zwischen PKC α_{wt} , PKC α_{CON} , PKC α_{IN} und His-PI3K γ_{wt} , PI3K $\gamma_{\Delta KIDO}$ bzw. zwischen PI3K $\gamma_{\Delta RBD}$ und PKC α_{wt} . Sf-9-Zellen wurden mit den entsprechenden Baculoviruslysaten für jeweils eine der GST-PKC α -Varianten und His-PI3K γ_{wt} bzw. His-PI3K $\gamma_{\Delta KIDO}$ co-infiziert (a). Sf-9-Zellen wurden mit den Baculoviruslysaten für His-PI3K γ_{wt} bzw. His-PI3K $\gamma_{\Delta RBD}$ und GST-PKC α_{wt} co-infiziert (b). Als Negativkontrolle wurde GST und His-PI3K γ_{wt} co-transfiziert (c). 72 h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und das jeweilige GST-PKC α -Fusionsprotein über GT-Sepharose aus den Zelllysaten isoliert. Das gereinigte Material wurde im SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und PI3K γ , PKC α sowie GST mit PI3K γ -B4-, PKC α - und GST-AK im WB charakterisiert.

Wie aus Tabelle 4.2 zu ersehen ist, waren die quantitativen Unterschiede in der Co-Reinigung von His-PI3K γ gering, lediglich der Wert für His-PI3K γ_{wt} /GST-PKC α_{CON} wich stark ab, was jedoch auf Unschärfen beim Western Blot zurückgeführt werden kann. Die Ergebnisse belegen, dass die Protein-Protein-Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α in vitro unabhängig vom Aktivitätsstatus

der Bindungspartner ist. Des Weiteren konnte die Ras-Bindedomäne und auch die Kinasedomäne von PI3K γ als alleiniger Bindebereich zwischen PKC α und PI3K γ ausgeschlossen werden.

infizierte PI3K γ -Variante	co-infizierte PKC α -Variante	relative Co-Reinigung von PI3K γ
His-PI3K γ_{wt}	GST-PKC α_{wt}	100 %
His-PI3K γ_{wt}	GST-PKC α_{In}	90 %
His-PI3K γ_{wt}	GST-PKC α_{Con}	87%
His-PI3K $\gamma_{\Delta KIDO}$	GST-PKC α_{wt}	95%
His-PI3K $\gamma_{\Delta KIDO}$	GST-PKC α_{In}	83%
His-PI3K $\gamma_{\Delta KIDO}$	GST-PKC α_{Con}	45%

Tab. 4.2: Relative Co-Reinigung von His-PI3K γ durch GST-Reinigung von GST-PKC α

Die Quotienten der Signalintensitäten für PI3K γ und PKC α wurde gebildet und für His-PI3K γ_{wt} /GST-PKC α_{wt} gleich 100 % gesetzt.

Eine Co-Reinigung zwischen co-transfiziertem PI3K β und GST-PKC α wurde nicht nachgewiesen (unveröffentlichte Daten, Scroblin, 2006). Dies deutet auf eine selektive Bindung zwischen PKC α und PI3K γ hin. Allerdings sind hier weiterführende Experimente nötig, um die Selektivität der Interaktion von PKC α mit PI3K γ weitergehend zu validieren.

4.3.3 Untersuchungen zur Transphosphorylierung zwischen PI3K γ und PKC α

Funktionelle Aspekte der Assoziation von PI3K γ und PKC α sollten durch In-vitro-Kinase-Assays untersucht werden. Da PI3K γ und PKC α über eine spezifische Proteinkinaseaktivität verfügen, wurde überprüft, ob infolge der Interaktion eine Transphosphorylierung zwischen PI3K γ und PKC α stattfindet. Dafür wurden In-vitro-Proteinkinase-Assays durchgeführt, in denen die Interaktionspartner in Gegenwart von [γ - 32 P]-ATP inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Proben im SDS-PAA-Gel separiert und im Autoradiogramm die Phosphorylierung anhand des Einbaus von 32 P am jeweiligen Protein bestimmt (Abb. 4.16). His-PI3K γ_{wt} und GST-PKC α_{wt} wurden einzeln und miteinander inkubiert, um Autophosphorylierungen von potentiellen gegenseitigen Phosphorylierungen unterscheiden zu können. Als Kontrollen wurden die Inhibitoren BIM und WM, die kinaseinaktiven Varianten GST-PI3K γ_{KR} und GST-PKC α_{In} sowie p85 α /p110 β eingesetzt. Im Autoradiogramm (Abb. 4.16) wurden radioaktiv markierte und somit in vitro 32 P-phosphorylierte Proteine mit drei verschiedenen Molekulargewichten detektiert. Diese Signale entsprechen His-PI3K γ , GST-PKC α und p85 α . Sowohl His-PI3K γ_{wt} als auch GST-PKC α_{wt} und in geringerem Ausmaß p85 α wurden phosphoryliert. Für His-PI3K γ_{wt} und GST-PKC α_{wt} wurde eine Autophosphorylierung nachgewiesen. Es wurde keine Phosphorylierung von GST-PI3K γ_{KR} , GST-PKC α_{In} und p110 β beobachtet. Die Phosphorylierung von GST-PKC α_{wt} in den Ansätzen mit His-

PI3K γ_{wt} war erheblich höher als die Autophosphorylierung. Diese Phosphorylierung wurde durch den PKC-Inhibitor BIM nicht gehemmt, was eine Autophosphorylierung von PKC α ausschließt. Der Einsatz des PI3K-Inhibitors WM hingegen führte zu einer deutlichen Reduktion der GST-PKC α_{wt} -Phosphorylierung. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass PI3K γ in der Lage ist, PKC α zu phosphorylieren. Eine Phosphorylierung von GST durch PI3K γ wurde durch Kinase-Assays mit His-PI3K γ_{wt} und GST ausgeschlossen, da kein phosphoryliertes GST detektiert wurde (nicht gezeigte Daten).

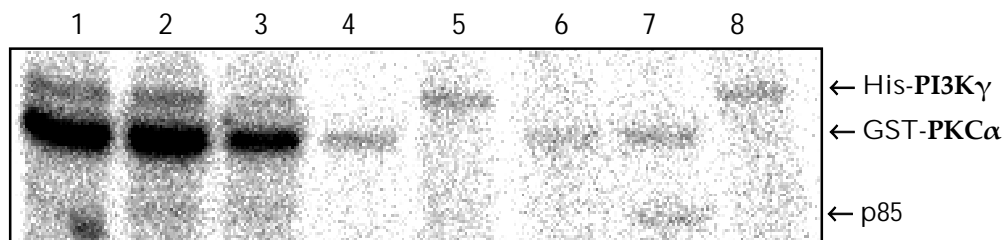


Abb. 4.16: Autoradiogramm des Proteinkinase-Assays mit PI3K γ und PKC α .

Je Proteinspezies wurden 0,125 μ g in eine Spur des 7,5-%ige PAA-Gels aufgetragen (für 0,5 μ g p85 α). Spur 1-3 enthalten sowohl His-PI3K γ_{wt} als auch GST-PKC α_{wt} , ohne Inhibitor (Spur 1), mit 100 nM BIM (Spur 2) bzw. 100 nM WM (Spur 3). Als Negativkontrollen wurde GST-PKC α_{wt} mit der kinaseinaktiven GST-PI3K γ_{KR} inkubiert (Spur 4) sowie His-PI3K γ_{wt} mit GST-PKC α_{in} (Spur 8). Außerdem wurde die Autophosphorylierung durch Einsatz von nur je einem Protein kontrolliert: His-PI3K γ_{wt} (Spur 5), GST-PKC α_{wt} (Spur 6), GST-PKC α_{in} (Spur 9). Zum Vergleich von PI3K γ mit einer Klasse-IA-PI3K wurde p85 α /p110 β mit GST-PKC α inkubiert (Spur 7). 32 P-markierte Proteine wurden mittels Autoradiographie detektiert. Abgebildet ist ein repräsentatives von 3 Experimenten.

4.3.4 Wechselseitiger Einfluss auf die Protein- bzw. Lipidkinaseaktivität

Um zu klären, ob die Phosphorylierung von PKC α durch PI3K γ Einfluss auf die spezifische Aktivität von PKC α ausübt, wurde im In-vitro-Proteinkinase-Assay die Phosphorylierung von Histonen untersucht, die als PKC α - aber nicht als PI3K γ -Substrat fungierten (Foukas and Shepherd, 2004). Dazu wurden rekombinantes PI3K γ und PKC α zusammen mit [γ - 32 P]-ATP, Histonen als Substrat, Lipiden und gegebenenfalls den Inhibitoren BIM (500 nM), WM (100 nM) bzw. LY294002 (1 μ M) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde PI3K γ oder PKC α allein eingesetzt. Die spezifische PKC α -Proteinkinaseaktivität wurde anhand des Einbaus von 32 P am Substrat (Histone) im Autoradiogramm bestimmt (Abb. 4.17).

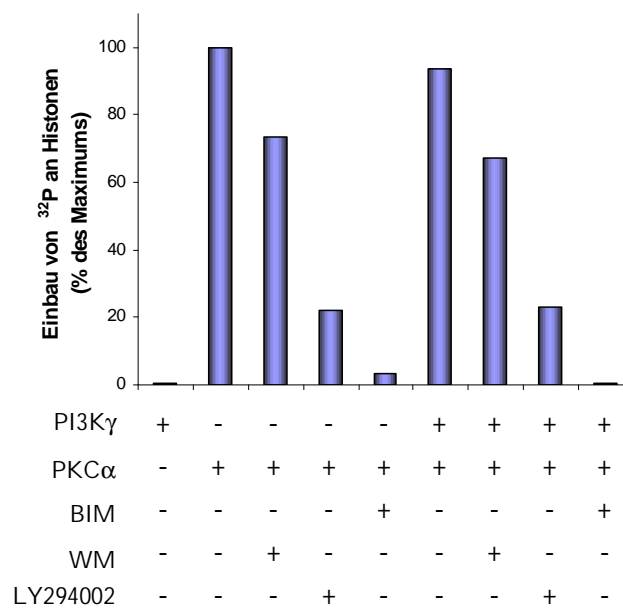


Abb. 4.17: Einfluss von PI3K γ auf die spezifische Proteinkinaseaktivität von PKC α

PI3K γ (0,2 μ g), PKC α (0,04 μ g) oder beide Proteine zusammen wurden mit PKC-Substrat Histone (0,1 μ g/ μ l), 100 nM Lipiden (DAG: PS: PC: PIP₃ im Verhältnis 5: 40: 45: 10), γ -³²P-ATP und gegebenenfalls 100 nM WM, 500 nM BIM oder 1 μ M LY294002 für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden im SDS-PAA-Gel separiert. Im Autoradiogramm wurde die PKC α -Proteinkinaseaktivität anhand der Histon-Phosphorylierung bestimmt und die Werte in Prozent zur maximalen Phosphorylierung dargestellt.

Durch dieses Experiment wurde nachgewiesen, dass PI3K γ erwartungsgemäß nicht zur Phosphorylierung der Histone beiträgt. Dagegen wurden Histone als PKC α -Substrat bestätigt. Die PKC α -Aktivität wird durch BIM fast vollständig inhibiert. Die Zugabe von PI3K γ bewirkte keinen Unterschied zur alleinigen PKC α -Proteinkinaseaktivität. Durch die Verwendung der Inhibitoren WM und LY294002 wurde die Phosphorylierung der Histone partiell reduziert. Da der gleiche Effekt aber auch in Abwesenheit von PI3K γ gezeigt wurde, ist dies auf eine unspezifische Inhibition von PKC α durch die PI3K-Inhibitoren zurückzuführen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass PI3K γ keinen Einfluss auf die spezifische Aktivität von PKC α ausübt. Die Wiederholung der Experimente in Abwesenheit von PI(3,4,5)P₃ führte zur gleichen Phosphorylierungsrate. In Abwesenheit von Lipiden war die PKC α -Proteinkinaseaktivität stark erniedrigt (nicht gezeigte Daten).

Parallel wurde auch untersucht, ob PKC α infolge der Bindung an PI3K γ Einfluss auf dessen Lipidkinaseaktivität nimmt. Dafür wurden PI3K γ und PKC α zusammen oder allein in Gegenwart von Liposomen inkubiert. Zur Kontrolle wurde außerdem die kinaseinaktive Variante PI3K γ_{KR} zusammen mit PKC α eingesetzt. Nach der Lipidextraktion wurden die extrahierten Lipide mittels Dünnschichtchromatographie getrennt und die Umsetzung von PI(4,5)P₂ zu PI(3,4,5)P₃ analysiert (Abb. 4.18).

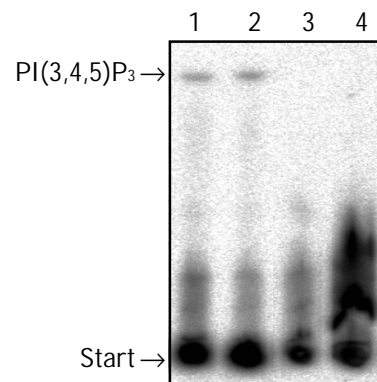


Abb. 4.18: PI3K γ -Lipidkinase-Assay

His-PI3K γ^{wt} und GST-PKC α^{wt} (Spur 1), His-PI3K γ^{wt} (Spur 2), GST-PKC α^{wt} (Spur 3) und GST-PI3K γ^{KR} mit GST-PKC α^{wt} (Spur 4) wurden in Gegenwart von Liposomen (bestehend aus 300 μ M PS und 30 μ M PI(4,5)P₂) und γ^{32} P-ATP für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Lipide wurden nach ihrer Extraktion im Dünnschichtchromatogramm getrennt und der Einbau von 32 P im Autoradiogramm analysiert

In allen Proben mit katalytisch aktiver PI3K γ kam es zum Einbau von Radioaktivität bei der Bildung von PI(3,4,5)P₃ aus PI(4,5)P₂ (Abb. 4.18, Spuren 1 u. 2). GST-PKC α und PI3K γ^{KR} zeigten keinerlei Lipidkinaseaktivität. Die Lipidkinaseaktivität von PI3K γ wurde durch PKC α nicht beeinflusst (Abb. 4.18, Spur 2).

4.4 Untersuchungen zur funktionellen Relevanz der PI3K γ -PKC α -Interaktion in neutrophilen Granulozyten

Um die physiologische Relevanz der gezeigten Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α zu bestimmen, wurden neutrophile Granulozyten stimuliert und die Dynamik der Komplexbildung in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus der Zellen überprüft. Stimulationsbedingte Änderungen in der Wechselwirkung können dabei Rückschlüsse auf eine potentielle Funktion der PI3K γ -PKC α Interaktion liefern.

Zur Untersuchung der Wechselwirkung wurden neutrophile Granulozyten aus peripherem, humanem Vollblut isoliert. Aliquote zu je 3 - 4 x 10⁷ Zellen wurden in Resuspensionspuffer aufgenommen und mit dem jeweiligen Stimulus entsprechend behandelt. Nach der Zelllyse erfolgte die standardgemäße Anreicherung von PI3K γ über Immunopräzipitation. Die immunologische Charakterisierung von PI3K γ und co-gereinigtem PKC α gab Aufschluss über Veränderungen in der Komplexbildung.

4.4.1 PI3K γ -PKC α -Interaktion nach fMLP-Stimulation

Das als Chemotaxin wirkende Peptid fMLP induziert die wichtigsten PI3K γ -abhängigen Reaktionen in neutrophilen Granulozyten, die gerichtete Migration der Zellen und die ROS-Produktion. Beide Prozesse werden innerhalb weniger Minuten nach Bindung von fMLP an seinen Rezeptor ausgelöst (Li et al., 2000; Hirsch et al., 2000; Condliffe et al., 2005). Neutrophile Granulozyten wurden über verschiedene Zeiträume von 0 - 120 s mit 1 μ M fMLP stimuliert. Die Analyse der Immunopräzipitation im Western Blot ergab, dass es 15 - 30 s nach Aktivierung der Zellen zu einer transienten Verstärkung der Interaktion kommt (Abb. 4.19a). Danach wurden neutrophile Granulozyten 30 s mit verschiedenen Konzentrationen von 0,1 μ M – 10 μ M fMLP stimuliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die Assoziation beider Proteine mit zunehmender fMLP-Konzentration von 0,1 μ M auf 1 μ M deutlich verstärkte (Abb. 4.19b). Die Konzentrationserhöhung auf 10 μ M fMLP zeigte keinen zusätzlichen stimulatorischen Effekt. Diese reproduzierbaren Ergebnisse belegen eindeutig, dass sich die Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α in Abhängigkeit der fMLP-Stimulation ändert.

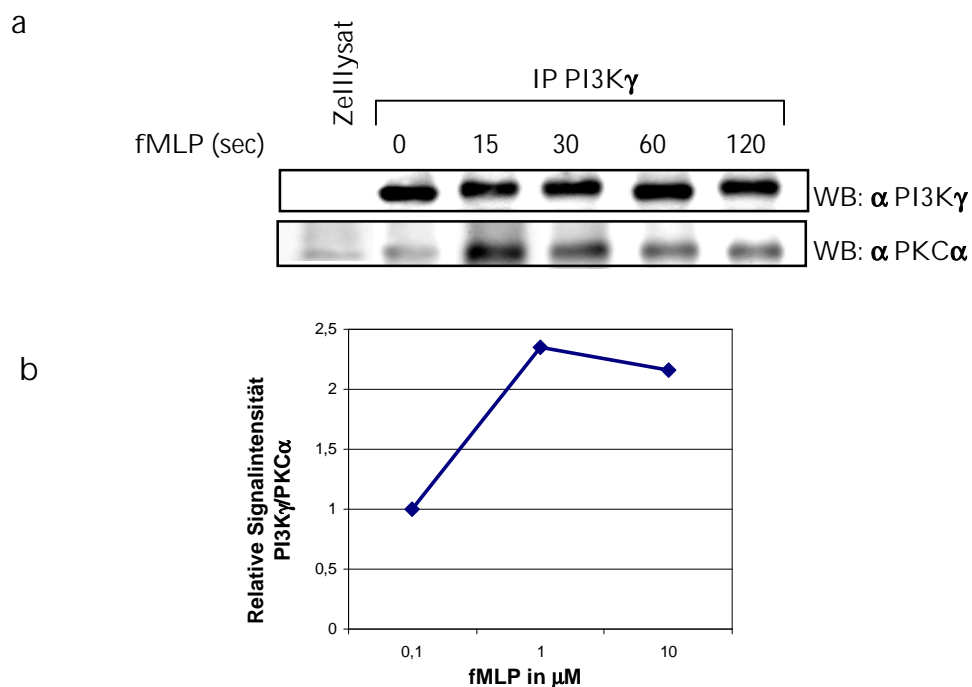


Abb. 4.19: Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α nach Stimulation neutrophiler Granulozyten mit fMLP. Je $3-4 \times 10^7$ neutrophile Granulozyten wurden in Resuspensionspuffer für 0 - 120 s mit 1 μ M fMLP (a) bzw. für 30 s mit 0,1 μ M, 1 μ M oder 10 μ M fMLP stimuliert (b). Die Reaktion wurde durch Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C abgestoppt. Nach der Zelllyse wurde PI3K γ standardgemäß über IP aus dem Zelllysat isoliert. Die Proteine wurden im 10-%igen SDS-PAA-Gel separiert und auf eine PVDF-Membran transferiert. Im WB erfolgte die Detektion von PI3K γ und co-gereinigtem PKC α mit PI3K γ -B4- bzw. PKC α -AK. Für die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit (b) wurden die Mengen an co-gereinigtem PKC α gegenüber der gereinigten PI3K γ -Menge quantifiziert und im Diagramm dargestellt. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes sind dargestellt.

4.4.2 Aktivierung von PI3K γ und PKC α nach fMLP-Stimulation

Die verstärkte Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen könnte auf eine fMLP-induzierte Aktivierung von PI3K γ oder PKC α bzw. beider Proteinen zurückzuführen sein. Ein Indiz für den Aktivitätsstatus von PI3K γ und auch PKC α ist deren Membranlokalisierung (Nixon and McPhail, 1999). Daher wurde die subzelluläre Verteilung beider Proteine nach fMLP-Stimulation bestimmt. Für diese Untersuchungen wurden neutrophile Granulozyten über 0 – 300 s mit 1 μ M fMLP stimuliert und die Zytosol- sowie die Membranfraktion präpariert. Beide Fraktionen wurden im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und die Präsenz von PI3K γ und PKC α im Western Blot immunologisch charakterisiert. Es konnte reproduzierbar demonstriert werden, dass fMLP eine transiente Membrantranslokation von PI3K γ als auch PKC α induziert. Die maximale Membranlokalisierung trat jeweils nach 60 bis 120 s auf und ging danach wieder auf das Ausgangsniveau zurück (Abb. 4.20). Daraus kann geschlossen werden, dass beide Bindungspartner infolge der fMLP-Stimulation parallel aktiviert wurden. Diese Beobachtung weist indirekt auf eine Co-Lokalisierung beider Proteine hin.

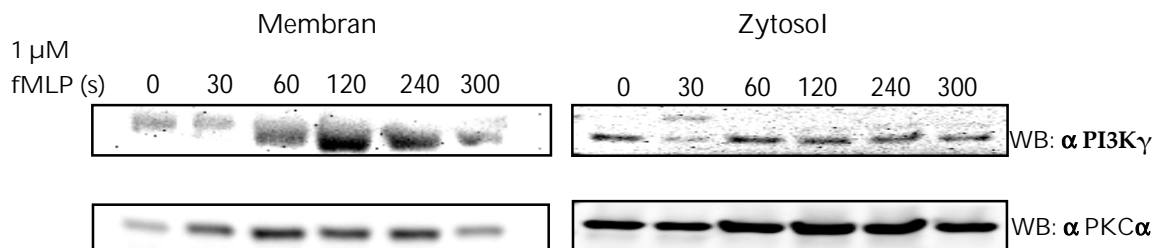


Abb. 4.20: Subzelluläre Verteilung von PI3K γ und PKC α nach Stimulation mit fMLP

1 x 10⁷ neutrophile Granulozyten wurden über 0 – 300 s mit 1 μ M fMLP stimuliert, aufgeschlossen und die Zytosol- bzw. die Membranfraktion aufgearbeitet. Jeweils gleiche Proteinmengen wurden im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Im WB wurde die Verteilung von PI3K γ und PKC α in den jeweiligen Fraktionen mit PI3K γ -B4 bzw. PKC α -AK immunologisch analysiert.

4.4.3 PI3K γ -PKC α -Interaktion nach TPA Stimulation

Die Bindung von fMLP an seinen G-Protein-gekoppelten Rezeptor führt zur Dissoziation der G-Proteine. Während PI3K γ durch die G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert wird, kommt es durch die G α -Untereinheiten zur Aktivierung von PLC β und somit zur Produktion von IP₃ und DAG (Li et al., 2000). Beide Substanzen tragen daraufhin zur Aktivierung von cPKCs bei. Es besteht also die Möglichkeit, dass PKC α über einen PI3K γ -unabhängigen Signalweg aktiviert wird und daraufhin mit PI3K γ in Wechselwirkung tritt. Damit würde PKC α in der Signaltransduktionskaskade oberhalb von PI3K γ wirken. Um zu klären, ob die Komplexbildung von PKC α zur PI3K γ durch die Aktivierung von PKC α vermittelt wird, wurden neutrophile Granulozyten mit dem PKC-aktivierenden Phorbol ester TPA stimuliert. Mehrere Arbeiten zeigten, dass TPA ebenso wie fMLP

in neutrophilen Granulozyten die ROS-Produktion induziert, wobei aber nur der fMLP induzierte Signalweg PI3K γ einschließt (Vlahos et al., 1995; Ding et al., 1995; Condliffe et al., 2005;). Somit konnte eine Aktivierung von PI3K γ ausgeschlossen werden.

Da TPA nicht rezeptorvermittelt wirkt, sondern durch Diffusion ins Zellinnere gelangt, musste davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung von PKC α im Gegensatz zur fMLP-Stimulation zeitverzögert einsetzt. Aus diesem Grund wurde die maximale Behandlungsdauer auf 600 s ausgedehnt. Danach wurde PI3K γ standardgemäß über Immunopräzipitation isoliert. Die Wechselwirkung zwischen PI3K γ und PKC α wurde im Western Blot analysiert (Abb. 4.21).

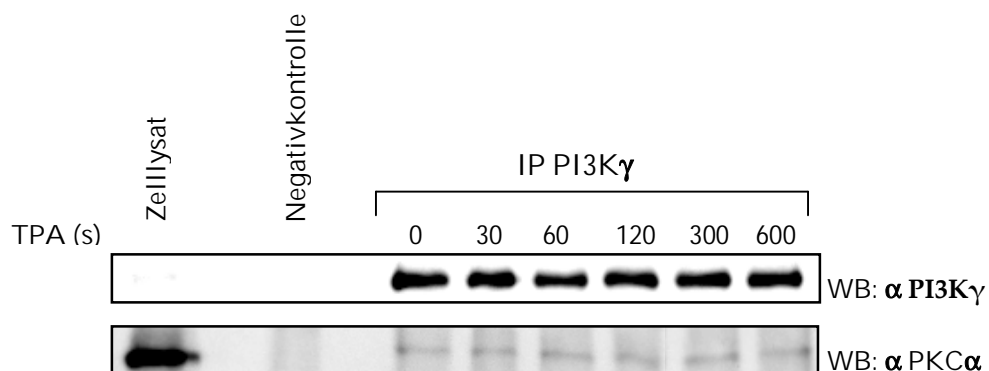


Abb. 4.21: Wechselwirkung zwischen PI3K γ und PKC α nach Stimulation mit TPA

Je $4 - 6 \times 10^7$ neutrophile Granulozyten wurden für 0 - 600 s mit 100 nM TPA behandelt. Die Reaktion wurde durch Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C abgestoppt und die Zellen sofort lysiert. PI3K γ wurde daraufhin standardgemäß über IP aus dem Zelllysate isoliert und die Proben zusammen mit einem Aliquot des Gesamtzelllysates und einer Negativkontrolle im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte im WB die Detektion von PI3K γ und co-gereinigtem PKC α .

Im untersuchten Zeitraum wurde keine Steigerung der PI3K γ -PKC α -Wechselwirkung durch die TPA-Stimulation beobachtet. Das Ergebnis belegt, dass die alleinige Aktivierung von PKC α für die Komplexbildung mit PI3K γ nicht ausreicht. Damit kann die Komplexbildung als direkte Folge der PLC β -induzierten PKC α -Aktivität ausgeschlossen werden.

4.4.4 PI3K γ -PKC α -Interaktion nach IL-8-Stimulation

Das folgende Experiment sollte klären, in welchem der fMLP-induzierten Signalwege die Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α eingebunden ist. Da sowohl bei der Migration als auch bei der ROS-Produktion PI3K γ und cPKCs eine Rolle spielen, wurden beide Prozesse in Betracht gezogen. Eine selektive Aktivierung der Zellen ist mit Interleukin-8 (IL-8) möglich.

IL-8 wirkt ebenso wie fMLP als Chemotaxin und die IL-8-Stimulation von neutrophilen Granulozyten induziert bei Aktivierung von PI3K γ die gerichtete Migration der Zellen (Fuhler et

al., 2005; Knall et al., 1997). Die ROS-Produktion aber kann durch IL-8-Stimulation allein nicht ausgelöst werden. Die Behandlung von humanen neutrophilen Granulozyten mit IL-8 führt lediglich zu einem Priming-Effekt für die fMLP-vermittelte Phosphorylierung von p47^{phox} (Guichard et al., 2005).

Neutrophile Granulozyten wurden über 0 - 120 s mit 100 ng/ml IL-8 stimuliert und die Wechselwirkung zwischen PI3K γ und PKC α nach Immunopräzipitation von PI3K γ standardgemäß im Western Blot analysiert. Abb. 4.22 zeigt, dass die Stimulation mit IL-8 keine verstärkende Wirkung auf die Wechselwirkung zwischen PI3K γ und PKC α hatte. Vielmehr konnte eine leichte Verringerung der Assoziation beider Proteine detektiert werden.

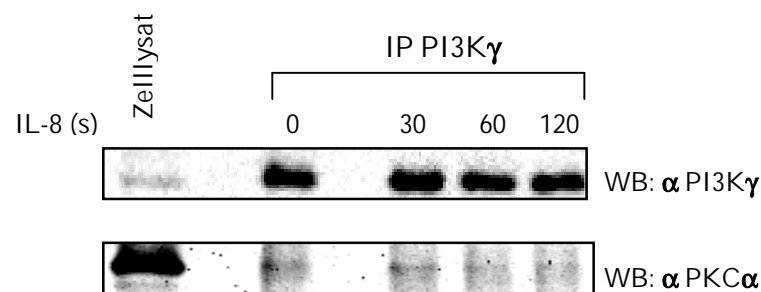


Abb. 4.22: Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α in neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit IL-8. Je $4\text{-}6 \times 10^7$ neutrophile Granulozyten wurden für 0 - 120 s mit 100 ng/ml IL-8 stimuliert. PI3K γ wurde standardgemäß über IP aus dem Zelllysate isoliert und die Proben zusammen mit einem Aliquot des Gesamtzelllysates im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. PI3K γ sowie co-gereinigtes PKC α wurde im WB mit PI3K γ -B4- bzw. PKC α -AK immunologisch analysiert.

Anhand dieses Befundes kann geschlossen werden, dass die in Abb. 4.19a dargestellte Interaktionssteigerung nicht im Zusammenhang mit fMLP-induzierter Zellmigration steht. Dies deutet darauf hin, dass die Assoziation zwischen PI3K γ und PKC α durch Signalwege beeinflusst wird, welche in Verbindung mit der ROS-Produktion stehen.

4.4.5 ROS-Produktion

Um die Induktion der ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten durch die bisher verwendeten Agonisten (fMLP, TPA und IL-8) zu untersuchen, wurde die O₂^{•-}-Bildung der Zellen gemessen. O₂^{•-}, ein Hauptprodukt der NADPH-Oxidase, reagiert mit Lucigenin und bewirkt dessen Chemolumineszenz. So wurden neutrophile Granulozyten in HBSS/BSA mit 200 nM Lucigenin resuspendiert und nach Zugabe des jeweiligen Agonisten die Chemolumineszenz von Lucigenin ermittelt. Die Ergebnisse sind als integrierte Intensitätswerte in Abb. 4.23a und b dargestellt. Wie erwartet, führte die Stimulation der Zellen mit IL-8 zu keiner detektierbaren

Produktion von O_2^{\bullet} , wohingegen fMLP eine schnelle, transiente O_2^{\bullet} -Produktion mit einem Maximum zwischen 30 s und 100 s induzierte (Abb. 4.23b). Die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit TPA bewirkte ebenfalls eine deutliche Stimulation der O_2^{\bullet} -Produktion. Das Maximum wurde hier erst nach ca. 12 min (720 s) erreicht (Abb. 4.23b). Vergleicht man den Zeitpunkt der fMLP-induzierten Steigerung der PI3K γ -PKC α Interaktion mit der maximalen O_2^{\bullet} -Produktion (15 – 30 s bzw. 30 – 100 s nach fMLP Zugabe) kann geschlussfolgert werden, dass die Interaktion eine Rolle bei der Initiierung der ROS-Produktion haben kann.

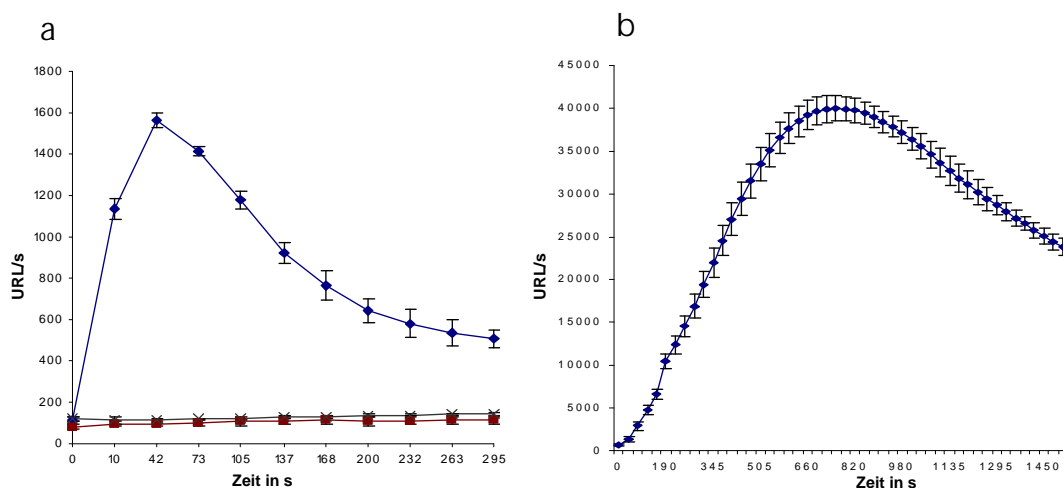


Abb. 4.23: O_2^{\bullet} -Produktion nach Stimulation mit fMLP, IL-8 oder TPA

Zur Messung der O_2^{\bullet} -Produktion wurden je 1×10^6 neutrophile Granulozyten in HBSS/ 0,1% (v/v) BSA/ 200 nM Lucigenin eingestellt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Stimulation mit 1 μ M fMLP (\blacklozenge), 100 ng/ml IL-8 (\circ) oder DMSO = Blank (\times) wurde über einen Zeitraum von 300 s gemessen (a). Nach Stimulation mit 100 nM TPA wurde bis zu 25 min (1500 s) gemessen (b). Die Messdaten sind als integrierte Intensitäts-Zählung angegeben (URL/s = relative Units/s). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten.

Um den Einfluss von PI3K γ auf die ROS-Produktion genau zu untersuchen, wurden in einem zweiten Versuchsansatz die Zellen vor der fMLP- Stimulation mit einem spezifischen PI3K γ -Inhibitor (AS252424) vorbehandelt. Bei einer Inhibitor-Konzentration von 1 μ M war die O_2^{\bullet} -Produktion um 7 % und bei einer Konzentration von 10 μ M um 60 % reduziert (Abb. 4.24). Dies stand in Übereinstimmung zu Daten von Condliffe et al, die unter Nutzung des gleichen Isoform-spezifischen Inhibitors ähnliche Effekte erzielten. Dass erst eine hohe Inhibitor-Konzentration zu funktionellen Effekten führte, kann durch eine schlechte Zellpermeabilität der Substanz erklärt werden (Condliffe et al. 2005).

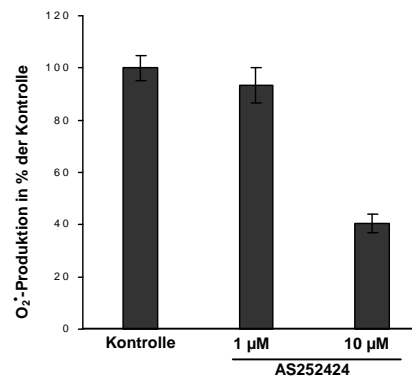


Abb. 4.24: Effekte der Inhibition von PI3K γ auf die fMLP- induzierte O₂^{•-}-Produktion

Je 1×10^6 neutrophile Granulozyten wurden für 30 min in Resuspensionspuffer mit 1 μ M, 10 μ M AS252424 oder DMSO als Kontrolle vorbehandelt. Die Messung der O₂^{•-}-Produktion erfolgte unter den in Abb. 4.23a dargestellten Bedingungen. Die Gesamtmengen der O₂^{•-}-Produktion über einen Zeitraum von 5 min sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten als prozentuale Angabe bei Kontrolle = 100 % dargestellt.

Zusammenfassend wurde durch die oben dargestellten Ergebnisse ein klarer Beweis für den Einfluss von PI3K γ auf die ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten erbracht.

4.4.6 Effekt der PI3K γ -Inhibition auf die PI3K γ -PKC α -Wechselwirkung

Es werden verschiedene Wege diskutiert, über die PI3K Einfluss auf die fMLP-induzierte ROS-Produktion nehmen kann. Dabei wird hauptsächlich die Lipidkinaseaktivität in den Vordergrund gestellt. So schlagen Welch et al. die PIP₃ abhängige Regulierung von Rac vor, während Babior auf die Aktivierung von atypischen PKCs durch PIP₃ verweist (Babior, 1999; Welch et al., 2003). Es wird außerdem diskutiert, dass Akt p47^{phox} phosphorylieren kann (Chen et al., 2003; Hoyal et al., 2003). Da aber PI3K γ auch über kinaseunabhängige Protein-Protein-Interaktionen Einfluss auf Bindungspartner nehmen kann (Patrucco, et al. 2004), wurde im nächsten Experiment untersucht, inwieweit die Kinaseaktivität von PI3K γ für die verstärkte Assoziation zwischen PI3K γ und PKC α nach fMLP-Stimulation verantwortlich ist. Dafür wurden neutrophile Granulozyten 30 min mit 10 μ M AS252424 vorbehandelt, bevor sie für 0 - 120 s mit 1 μ M fMLP stimuliert und PI3K γ mittels Immunopräzipitation gereinigt wurde (Abb. 4.25). Auf diese Weise war sowohl die Lipid- als auch die Proteinkinaseaktivität des Proteins blockiert.

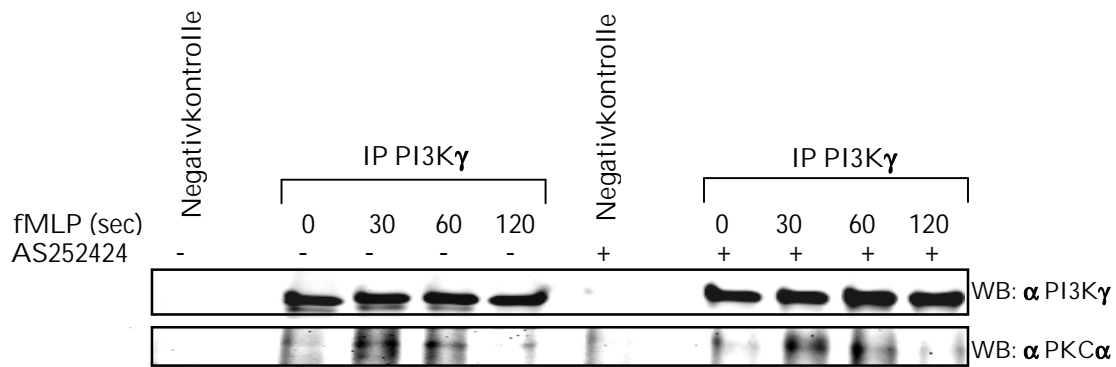


Abb. 4.25: Effekt der PI3K γ -Inhibition auf die Wechselwirkung zwischen PI3K γ und PKC α

Je $4 - 5 \times 10^7$ neutrophile Granulozyten wurden für 30 min mit 10 μ M AS252424 bei 37 °C vorbehandelt und anschließend für 0 – 120 s mit 1 μ M fMLP stimuliert. PI3K γ wurde standardgemäß über IP aus dem Zelllysats isoliert, die Proben im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Im WB erfolgte die immunologische Analyse von PI3K γ und PKC α .

Die immunologische Analyse von PI3K γ und co-gereinigtem PKC α im Western Blot ergab, dass die Inhibition der PI3K γ -Kinaseaktivität die Komplexbildung in Bezug auf die fMLP-Stimulation zwischen beiden Proteinen nicht beeinflusste. Daraus lässt sich schließen, dass die Ausbildung der Interaktion von der Lipid- bzw. Proteinkinaseaktivität von PI3K γ unabhängig ist.

4.4.7 Zytosolische Komponenten der NADPH-Oxidase als Bindungspartner von PI3K γ

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Wechselwirkung zwischen PI3K γ und PKC α eine Rolle bei der Induktion der ROS-Produktion spielt. In vitro wurde gezeigt, dass PKC α durch die Phosphorylierung von p47^{phox} zur Aktivierung der NADPH-Oxidase beitragen kann (Fontayne et al., 2002). Darauf Bezug nehmend wurde im folgenden experimentellen Ansatz überprüft, ob ein Multiprotein-Komplex existiert, der neben PI3K γ und PKC α auch p47^{phox} einschließt. Dazu wurde die Immunopräzipitation von PI3K γ wiederholt (s. Abb. 4.19a) und im Western Blot co-gereinigtes p47^{phox} immunologisch analysiert. In Abb. 4.26 ist gezeigt, dass auch p47^{phox} über PI3K γ co-gereinigt wurde. Darüber hinaus trat in Analogie zu PKC α nach fMLP-Stimulation eine Verstärkung der Wechselwirkung mit PI3K γ auf. Auch der Zeitpunkt der maximalen Assoziation zwischen PI3K γ und p47^{phox} 15 - 30 s nach Stimulation entsprach der stärksten Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α (vgl. Abb. 4.19a). Dieser Befund indiziert, dass es infolge der fMLP-Stimulation zur Bildung eines Multiproteinkomplexes kommt, der PI3K γ , PKC α und p47^{phox} einschließt. Das Ergebnis bestätigte unsere Hypothese, dass die PI3K γ -PKC α Wechselwirkung eine Rolle in der Regulierung der fMLP-stimulierten ROS-Produktion spielt.

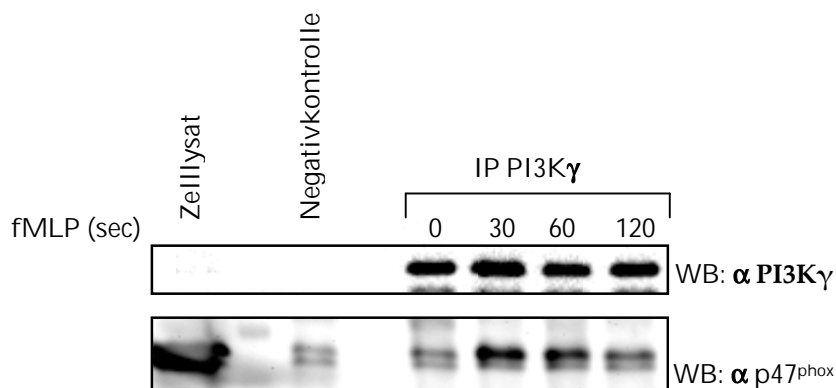


Abb. 4.26: Interaktion zwischen PI3K γ und p47^{phox} in neutrophilen Granulozyten nach fMLP-Stimulation
Je $4 - 6 \times 10^7$ neutrophile Granulozyten wurden für 0 - 120 s mit 1 μ M fMLP stimuliert. PI3K γ wurde über IP aus dem Zelllysate isoliert, die Proben sowie ein Aliquot des Gesamtzelllysates und die Negativkontrolle im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. PI3K γ bzw. co-gereinigtes p47^{phox} wurde im WB mit PI3K γ -B4- bzw. polyklonalem p47^{phox}-AK nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentatives von 4 Experimenten.

Infolge der fMLP-Stimulation wird p47^{phox} schrittweise hyperphosphoryliert. Es wurde gezeigt, dass PKC α in vitro p47^{phox} an verschiedenen Serinresten phosphorylieren kann (Fontayne et al., 2002). Um zu überprüfen, ob die im Komplex assoziierten p47^{phox}-Moleküle phosphoryliert sind, wurde die Serin-Phosphorylierung immunologisch analysiert, bevor die Membran gestrippt und mit p47^{phox}-Antikörper behandelt wurde (Abb. 27a). Als Referenz wurde auch im Zelllysate die Serin-Phosphorylierung von p47^{phox} charakterisiert (Abb. 27b).

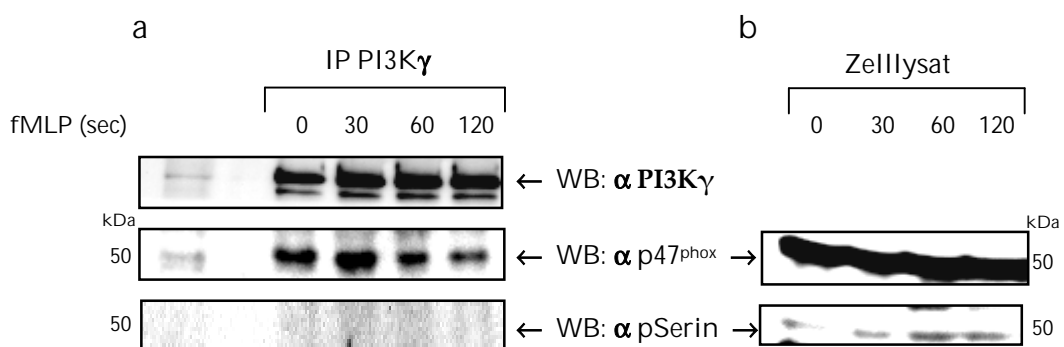


Abb. 4. 27: Untersuchung der Serin-Phosphorylierung von p47^{phox}
Je 4×10^7 neutrophile Granulozyten wurden für 0 - 120 s mit 1 μ M fMLP stimuliert. PI3K γ wurde über IP aus dem Zelllysate isoliert und die Proben sowie ein Aliquot des Gesamtzelllysates (a) bzw. Gesamtzelllysate aller Stimulierungszeiträume (b) im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. In einem ersten Detektionsschritt wurde PI3K γ bzw. phosphorylierte Serinreste mit PI3K γ -B4- bzw. pSerin-AK immunologisch analysiert. Anschließend wurde p47^{phox} mit p47^{phox}-AK detektiert.

Im Bereich der co-gereinigten p47^{phox}-Moleküle traten keine detektierbaren Signale für phosphorylierte Serinreste auf (Abb. 27a). Jedoch wurde im Gesamtzelllysate ein Anstieg von phosphorylierten Serinresten auf Höhe des Molekulargewichtes von p47^{phox} nachgewiesen (Abb.

27b). Vergleicht man im Zelllysats die Intensität der pSerin-Signale mit den spezifischen p47^{phox}-Signalen, wird deutlich, dass entweder nur ein geringer Anteil von p47^{phox} infolge der fMLP-Stimulation an Serinresten phosphoryliert vorliegt, oder aber der pSerin-Antikörper im Gegensatz zum p47^{phox}-Antikörper eine viel geringere Sensitivität besitzt.

Nach der Identifizierung von p47^{phox} wurde untersucht, ob weitere zytosolische Mitglieder der NADPH-Oxidase, wie p67^{phox} oder Rac2 (Babior, 2002) Bestandteil des Muliproteinkomplexes mit PI3K γ , PKC α und p47^{phox} sind.

Dafür wurde die fMLP-stimulierte Komplexbildung von PI3K γ über Immunopräzipitation (vgl. Abb. 4.19a) und anschließender Detektion von p67^{phox} und Rac2 analysiert (Abb. 4.28). Dabei konnte weder für p67^{phox} noch für Rac2 ein Signal in den PI3K γ -Immunopräzipitationen detektiert werden. Da p67^{phox} im Gesamtzelllysats auch nur ineffizient nachgewiesen wurde (Abb. 4.28, erste Spur), liegt möglicherweise potentiell co-gereinigtes p67^{phox} im Western Blot unter der Nachweisgrenze.

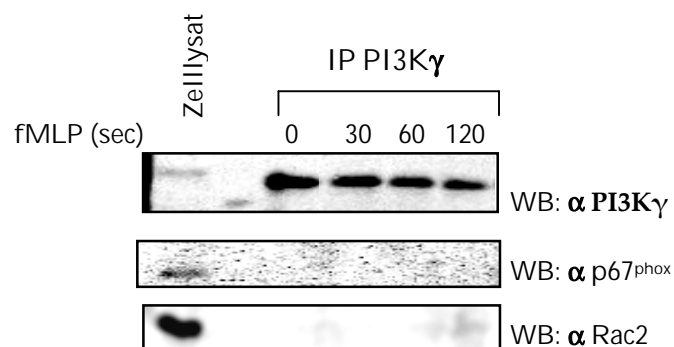


Abb. 4.28: Interaktion von PI3K γ und p67^{phox} bzw. Rac2 nach Stimulation mit fMLP

Je 4×10^7 neutrophile Granulozyten wurden für 0 - 120 s mit 1 μ M fMLP stimuliert. PI3K γ wurde über IP aus dem Zelllysats isoliert und die Proben zusammen mit einem Aliquot des Gesamtzelllysates im 12,5-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. PI3K γ sowie co-gereinigtes p67^{phox} bzw. co-gereinigtes Rac2 wurden im WB mit PI3K γ -B4- bzw. p67^{phox}- oder Rac2-AK charakterisiert.

4.4.8 Zweite Phase der PI3K γ -PKC α -p47^{phox}-Komplexbildung

Sollte die Interaktion von PI3K γ , PKC α und p47^{phox} auf den fMLP Stimulus hin allein der Initiierung der ROS-Produktion dienen, so kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktion nach Abschluss der ROS-Produktion wieder auf das Ausgangsniveau zurückgeht. Aus Abb. 4.19a und Abb. 4.26 aber wird deutlich, dass 120 s nach Stimulation zwar keine maximale, jedoch noch eine verstärkte Assoziation zwischen PI3K γ und PKC α bzw. p47^{phox} im Vergleich zu unstimulierten Zellen zu beobachten war. In Abb. 4.23a ist gezeigt, dass die O₂^{•-}-Produktion erst nach ca. 4 min beendet ist. Um zu prüfen, ob sich der nachgewiesene Proteinkomplex mit der Beendigung der ROS-Produktion wieder auflöst, wurden neutrophile Granulozyten in nachfolgenden Experimenten für Zeitperioden von 2 - 10 min mit fMLP stimuliert und PI3K γ standardgemäß aus dem Zelllysats isoliert. Im Western Blot wurde die Menge an co-gereinigtem PKC α und p47^{phox} untersucht (Abb. 4.29).

Überraschenderweise konnte eine Zunahme der Assoziation zwischen PKC α und PI3K γ , aber auch zwischen PI3K γ und p47^{phox} beobachtet werden. Die maximale Interaktion wurde zwischen 5 bis 7 min nach Aktivierung detektiert. Auch für PKC β II konnte nach 7 min eine Rückkehr der Komplexbildung mit PI3K γ gefunden werden (nicht gezeigte Daten). Es kommt demnach zu einem zweiten Anstieg in der Komplexbildung infolge der fMLP-Stimulierung von neutrophilen Granulozyten. Zu diesem Zeitpunkt jedoch ist die fMLP-induzierte O₂^{•-}-Produktion nahezu beendet (vgl. Abb. 4.23a).

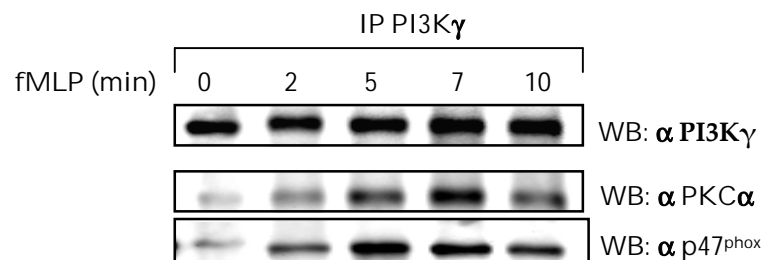


Abb. 4.29: Interaktion zwischen PI3K γ und p47^{phox} in neutrophilen Granulozyten nach fMLP-Stimulation
Je 4×10^7 neutrophile Granulozyten wurden in Resuspensionspuffer aufgenommen und für 0 - 10 min mit 1 μ M fMLP stimuliert. PI3K γ wurde über IP aus dem Zelllysats isoliert. Das aufgereinigte Material wurde im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Im WB erfolgte die Detektion von PI3K γ und co-gereinigtem PKC α bzw. co-gereinigtem p47^{phox} mit den entsprechenden AK. Abgebildet ist ein repräsentatives von 3 verschiedenen Experimenten.

Um zu untersuchen, ob diese späte Assoziation von PI3K γ mit PKC α und p47^{phox} ebenso wie die Interaktionsverstärkung 15 - 30 s nach fMLP-Stimulation unabhängig von der PI3K γ -Kinaseaktivität ist, wurden neutrophile Granulozyten vor der fMLP-Stimulation mit Wortmannin vorbehandelt (Abb. 4.30).

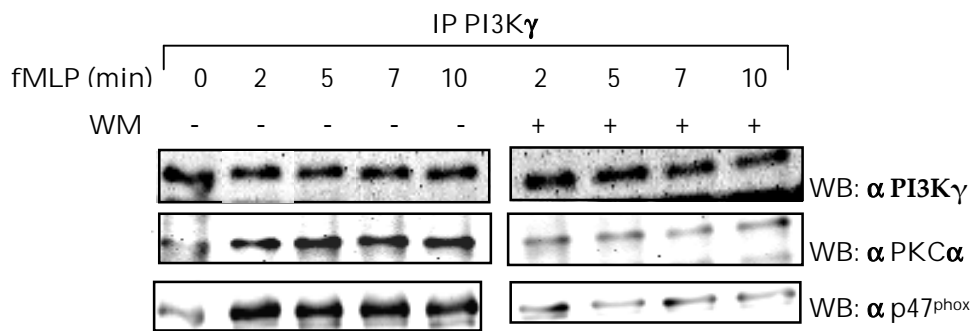


Abb. 4.30: Effekt von WM auf die fMLP- induzierte Wechselwirkung zwischen PI3K γ und PKC α

Je 3×10^7 neutrophile Granulozyten wurden gegebenenfalls für 30 min mit 100 nM WM vorbehandelt und anschließend für 0 – 10 min mit $1 \mu\text{M}$ fMLP stimuliert. PI3K γ wurde über IP aus dem Zelllysat isoliert, die Proben im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Im WB erfolgte die Detektion von PI3K γ und co-gereinigtem PKC α bzw. p47^{phox} mit den spezifischen AK.

In Wortmannin-behandelten Zellen konnte kein deutlicher Anstieg der Assoziation von PI3K γ zu PKC α und p47^{phox} festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass im Gegensatz zur Komplexformation nach 15 - 30 s die Kinaseaktivität von PI3K γ für die zweite Phase der Komplexbildung zwischen PI3K γ , PKC α und p47^{phox} benötigt wird. Die funktionelle Relevanz dieser späten Komplexbildung muss durch weiterführende Studien analysiert werden.

4.4.9 Interaktion zwischen PI3K γ und weiteren PKC-Isoformen

In neutrophilen Granulozyten existieren neben PKC α die PKC-Isoformen PKC β I, PKC β II, PKC δ und PKC ζ (Selvatici et al., 2006). Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, welche der Isoformen in vivo an der fMLP-stimulierten Phosphorylierung von p47^{phox} und somit der Initiierung der ROS-Produktion beteiligt sind. Doch einige Arbeiten deuten darauf hin, dass neben PKC α auch PKC β II und PKC ζ in die ROS-Produktion oder die Phagozytose eingebunden sind (Dekker et al. 2000; Dang et al., 2001; Selvatici et al., 2002).

Um zu untersuchen, ob infolge der fMLP-Stimulation von neutrophilen Granulozyten neben PKC α weitere PKC-Isoformen mit PI3K γ interagieren, wurde in weiteren Experimenten die Co-Reinigung von PKC β I, PKC β II, PKC ζ oder PKC δ im Western Blot mit PKC-spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 4.31).

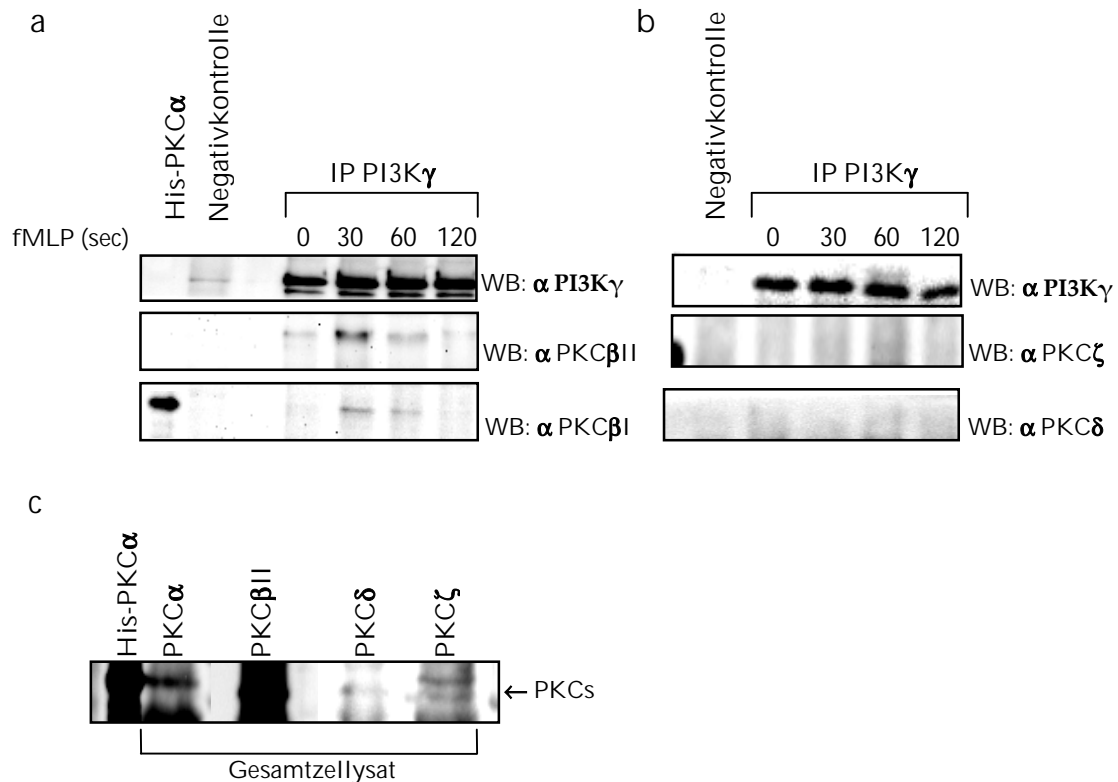


Abb. 4.31: Interaktion zwischen PI3K γ und PKC β II, PKC β I, PKC ζ und PKC δ nach Stimulation mit fMLP
 Je 4×10^7 neutrophile Granulozyten wurden für 0 - 120 s mit 1 μ M fMLP stimuliert. PI3K γ wurde standardgemäß über IP aus dem Zelllysate isoliert und die Proben zusammen mit der Negativkontrolle im 10-%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Im WB erfolgte die immunologische Analyse von PI3K γ sowie (a) PKC β I u. PKC β II bzw. (b) PKC ζ u. PKC δ mit spezifischen AK. (c) In Aliquoten des Gesamtzelllysates wurde PKC α , PKC β II, PKC δ bzw. PKC ζ detektiert. Als Positivkontrolle diente rekombinantes His-PKC α .

Es konnte gezeigt werden, dass PKC β II in Analogie zu PKC α mit PI3K γ interagiert und sich diese Wechselwirkung infolge des fMLP-Stimulus transient nach ca. 30 s verstärkt. Auch für PKC β I wurde 30 und 60 s nach fMLP-Stimulation ein Signal in der PI3K γ -Immunopräzipitation detektiert. Da der PKC β I-Antikörper jedoch mit rekombinanten PKC α kreuzreagiert, kann an dieser Stelle keine eindeutige Aussage über die Assoziation von PKC β I mit PI3K γ gemacht werden. PKC ζ und PKC δ waren in analogen experimentellen Ansätzen nicht als Bindungspartner von PI3K γ nachweisbar. Da jedoch im Vergleich zu PKC α , PKC β I und PKC β II eine schwache Detektion von PKC ζ und PKC δ im Gesamtzelllysate erreicht wurde (nicht gezeigte Daten), kann nicht ausgeschlossen werden, dass co-gereinigte Proteine im Western Blot nicht detektierbar waren.

5. Diskussion

Die größte Herausforderung der postgenomischen Ära ist das Verständnis, wie genetische Information in zeit- und ortsabhängige Funktionen der Genprodukte umgesetzt wird. Viele Proteine sind in komplexe Signalwege eingebunden, bei denen Protein-Protein-Interaktionen die Signalweiterleitung vermitteln. Das trifft auch auf das multifunktionelle Signalprotein PI3K γ zu. Während die Lipidkinaseaktivität über die Bildung des second messenger PI(3,4,5)P₃ eine zentrale Rolle in der Weiterleitung PI3K γ -vermittelter Signale einnimmt, gewann durch neue Erkenntnisse in den letzten Jahren die Proteinkinaseaktivität und kinaseunabhängige Proteininteraktionen von PI3K γ zunehmend an Bedeutung (zusammengefasst in Wetzker, 2004).

Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, die multifunktionellen Eigenschaften von PI3K γ durch Identifizierung und Charakterisierung von neuen Bindungspartnern weitergehend zu beschreiben. Der Schwerpunkt unserer Untersuchungen bezog sich dabei auf die Aufklärung der Wirkungsweise von PI3K γ in neutrophilen Granulozyten.

5.1 Tandem Affinity Purification von PI3K γ und p101

Zu Beginn dieser Studie sollten neue Interaktionspartner von PI3K γ nach Isolierung PI3K γ -assoziierter Proteinkomplexe durch massenspektrometrische Analysen identifiziert werden. Die fortschreitende Entwicklung in der Massenspektrometrie erlaubt heute, geringste Proteinmengen zu analysieren. Damit liegt der limitierende Faktor meist in der Reinigung der Proteinkomplexe. Gerade bei Signalproteinen, welche häufig nur in geringen Konzentrationen in der Zelle vorliegen, ist eine Isolierung oft schwierig (Honey et al., 2001). Nicht selten werden co-gereinigte Proteine von unspezifisch bindenden Strukturproteinen und abundanten house keeping-Proteinen überlagert und deren Identifizierung dadurch erschwert (Cox et al., 2002). Unser Ziel war es, PI3K γ unter physiologischen Bedingungen aus der Zelle zu reinigen und dabei die Isolierung natürlich vorkommender Interaktionspartner in einem hohen Reinheitsgrad zu ermöglichen. Dafür wurde eine neu entwickelte Reinigungsmethode, die Tandem Affinity Purification, getestet.

5.1.1 Etablierung stabiler Zelllinien zu Synthese TAP-Epitop-markierter Fusionsproteine

Für PI3K γ und sein Adapterprotein p101 sollte die TAP-Reinigungsmethode, welche für die Isolierung von Proteinkomplexen aus der Hefe eingesetzt wurde (Rigaut et al., 1999), auf Säugerzellen angepasst werden.

Es wurden Plasmide hergestellt, die für TAP-PI3K γ , PI3K γ -TAP und TAP-p101 kodierten. Neutrophile Granulozyten sind primäre ausdifferenzierte Zellen mit einer kurzen Lebenszeit, die nach ihrer Isolierung nicht amplifizierbar und nicht transfizierbar sind. Damit war deren Verwendung für diese Experimente ausgeschlossen. Auf der Suche nach einem Modellsystem zur Synthese von TAP-Epitop-markierten Proteinen wählten wir die RBL2H3-Zellen, die als Mastzellenmodell dienen. Die Auswahl basierte auf der natürlichen Synthese des Zielproteins PI3K γ und dessen Einfluss auf grundlegende Funktionen in diesem Zelltyp (Laffargue et al., 2002; Wymann et al., 2003). Im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten existieren zwar funktionelle Unterschiede, es gibt aber auch Gemeinsamkeiten in PI3K γ -regulierten, zellulären Reaktionen. In beiden Zelltypen wird beispielsweise die Migration über PI3K γ -abhängige Signalwege gesteuert (Hirsch et al., 2000; Kitaura et al., 2005b). Folglich bestand die Möglichkeit, potentielle Protein-Protein-Wechselwirkungen aus RBL2H3-Zellen auf neutrophile Granulozyten übertragen zu können. Damit stellten RBL2H3-Zellen ein geeignetes System für die Identifizierung neuer PI3K γ -Bindungspartner dar.

Ein vorstellbarer Nachteil der Nutzung von Zellen mit natürlicher PI3K γ -Produktion ist die Konkurrenz von natürlichem und TAP-Epitop-markiertem Protein um potentielle Bindungspartner. Ein Mengenverlust an co-gereinigten Interaktionspartnern war dadurch nicht auszuschließen. Es bestand das Risiko, dass Proteine, die nur in geringer Molekülzahl an das Zielprotein binden, in der späteren Proteindetektion unter der Nachweisbarkeitsgrenze liegen. Aus diesem Grund wurden parallel HEK293-Zellen, welche keine natürliche Synthese von PI3K γ aufweisen, als zweites Untersuchungssystem gewählt.

Um dauerhaft auf ausreichend Zellmaterial zur Isolierung der Fusionsproteine zugreifen zu können und die Reproduzierbarkeit der Experimente zu optimieren, sollten stabil transfizierte Zelllinien erzeugt werden. In stabil transfizierten Zellen wurde teilweise ein verringertes Wachstum der transfizierten Zellen im Vergleich zur Wildtyppopulation festgestellt. Dieses Phänomen beschränkte sich fast ausschließlich auf RBL2H3-Zellen. Zusätzlich kam es in diesem Zelltyp zu Veränderungen in der Synthese der TAP-Epitop-markierten Proteine oder zu Mutationen des Fusionsproteins selbst. Dagegen zeigten HEK293-Klone eine stabile Synthese von PI3K γ -TAP und TAP-PI3K γ . Dieser Befund lässt darauf schließen, dass in Zellen mit natürlicher Synthese von PI3K γ , die zusätzliche Produktion von TAP-Epitop-markiertem PI3K γ die

physiologischen Funktionen der Zelle beeinflussten. Mutationen, welche die Synthese der Fusionsproteine verhinderten oder zur Synthese funktionell inaktiver PI3K γ -TAP-Proteine führten, bewirkten somit höchstwahrscheinlich einen Wachstumsvorteil dieser veränderten Zellen. Diese Befunde waren auch ein Beweis für die funktionelle Aktivität der produzierten Fusionsproteine. Auch die Arbeitsgruppe von Elis et al. hatte gezeigt, dass die stabile Synthese von TAP-Epitop-markierten Klasse IA PI3Ks in RBL2H3-Zellen nicht erreicht werden konnte. Hingegen bereitete die stabile Synthese des TAP-Epitop-markierten Adapterproteins p85 keine Probleme und führte zur erfolgreichen Isolierung von Proteinkomplexen (mündliche Mitteilung und Elis et al. 2004). Überraschender Weise gelang dies für das Adapterprotein TAP-p101 nicht. In transfizierte Zellen war nach wenigen Zellpassagen die Synthese von TAP-p101 stark reduziert. Das könnte unter anderem auf eine starke zytosolische Degradation von p101 zurückzuführen sein. So demonstrierten Brock et al. in HEK293-Zellen, die mit PI3K γ und p101 transfiziert bzw. co-transfiziert waren, dass p101 nur in Gegenwart der katalytischen Untereinheit PI3K γ proteolytisch stabil war (Brock et al., 2003). Um die aufgetretenen Probleme in RBL2H3-Zellen zu umgehen, erzeugten wir eine stabile RBL2H3-Zelllinie, in der die Synthese von TAP-PI3K γ während der Zellamplifikation reprimiert und zum gewünschten Zeitpunkt induziert werden konnte. Trotz der Repression konnte jedoch auch in dieser Zelllinie keine stabile induzierbare Synthese von TAP-PI3K γ erhalten werden.

5.1.2 Reinigung von TAP-Epitop-markiertem PI3K γ und p101

Ein weiteres Problem, welches die Identifizierung von PI3K γ -Bindungspartnern verhinderte, war die Effizienz der Reinigung der TAP-Epitop-markierten Proteine. Während im ersten Affinitätsreinigungsschritt die TAP-markierten Proteine über Bindung an IgG-Agarose vollständig aus den Zelllysaten isoliert wurden, konnte bei der darauf folgenden Spaltung mittels TEV-Protease im Durchschnitt weniger als die Hälfte des gebundenen Materials eluiert werden. Die Effizienz der Spaltung konnte auch nicht durch die Verwendung hoch konzentrierter TEV-Proteaselösung oder die Verlängerung der Enzymreaktion verbessert werden. Es ist anzunehmen, dass aufgrund ungünstiger Konformation die Zugänglichkeit der Schnittstelle für die Protease eingeschränkt war. Literaturbefunde zeigen, dass die C-terminale Lokalisierung des TAP-Epitops zu ineffizienter Reinigung führen kann, was durch die N-terminale Lokalisierung des Epitops umgangen werden konnte (Puig et al., 2001). Unsere Experimente ergaben, dass die N-terminal Lokalisierung des TAP-Epitops am PI3K γ oder auch p101 nicht zur Steigerung der TEV-Spaltung führte. Insgesamt war der Materialverlust so groß, dass von einer Weiterführung der Tandem Affinity Purification für die Isolierung PI3K γ assoziierter Proteinkomplexe abgesehen wurde.

Inzwischen gibt es vermehrt Literaturdaten, die darauf hinweisen, dass die Anwendung der Tandem Affinity Purification in Säugerzellen zu einer ineffizienter Reinigung der TAP-Epitop-markierten Proteine führt (Drakas et al., 2005; Schimanski et al., 2005).

Durch die Co-Reinigung von PI3K γ mit TAP-p101 konnte zumindest gezeigt werden, dass über TAP-Epitop-markierte Proteine natürlich vorkommende Bindungspartner gereinigt werden können.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass ineffiziente Synthese und Isolierung der Epitop-markierten Proteine unzureichend für die Aufreinigung natürlicher Proteinkomplexe und die Identifizierung seiner Komponenten mittels Massenspektrometrie war.

5.2 Identifizierung von PI3K γ -Interaktionspartnern

Da die Reinigung von Epitop-markiertem PI3K γ ineffizient war, wurden PI3K γ -assoziierte Komplexe parallel über Immunopräzipitation isoliert. Für die immunologische Aufreinigung von PI3K γ stand uns ein in unserer Arbeitsgruppe hergestellter PI3K γ -Antikörper zur Verfügung. Mehrere Versuche hatten gezeigt, dass mit Hilfe dieses Antikörpers endogenes PI3K γ spezifisch und effizient aus Zellextrakten isoliert werden kann (Bondeva et al., mündliche Mitteilung). Ein Nachteil der Immunopräzipitation ist, dass durch die Bindung des Antikörpers am Protein ein potentieller Protein-Bindeort blockiert wird. Doch im Gegensatz zur Epitop-Reinigung wurden durch diese Immunopräzipitation quantitative ausreichende Mengen an PI3K γ isoliert, um im PAA-Gel co-gereinigte Bindungspartner nachweisen zu können. Die massenspektrometrische Analyse der co-gereinigten Proteine aus RBL2H3-Zellen führte zur Identifizierung von Peptiden, die den Signalproteinen PLC γ 1 oder SHIP2 zugeordnet werden konnten. Bei der Validierung der Ergebnisse über immunologische Detektion im Western Blot konnte PLC γ 1 als Interaktionspartner in RBL2H3-Zellen bestätigt werden. Die Interaktion mit SHIP2 konnte dagegen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Für eine direkte Interaktion zwischen PLC γ 1 und PI3K γ gibt es in der Literatur keinerlei Anhaltspunkte. Es existieren jedoch in der Zelle funktionelle Überschneidungen und wechselseitige Beeinflussungen zwischen PI3K- und PLC-vermittelten Signalwegen. Die Aktivierung über Rezeptortyrosinkinasen führt zur Rekrutierung von PLC γ zur Zellmembran. Dort kommt es zur Spaltung von PI(4,5)P₂, dem Hauptsubstrat der Klasse I PI3K, in Diacylglycerol (DAG) und IP₃ (Rhee, 2001). Die Nutzung des gleichen Lipidsubstrates führt wahrscheinlich zur unmittelbaren räumlichen Nähe beider Signalproteine. Darüber hinaus weist die SH2-Domäne von PLC γ eine hohe Affinität zum PI3K-Lipidprodukt PI(3,4,5)P₃ auf, dessen Bindung zur Aktivierung und Membrantranslokation von PLC γ führen kann (Bae et al., 1998b). Ob eine direkte Bindung zwischen PI3K γ und PLC γ 1 besteht und ob die Interaktion zur Regulierung der PI3K γ - oder PLC γ 1-

Aktivität beiträgt, kann gegenwärtig nicht gesagt werden. Es sind weiterführende Experimente nötig, um die physiologischen Funktion der Wechselwirkung beider Proteine aufzuklären.

Aus dem Zelllysate neutrophiler Granulozyten konnte PLC γ über PI3K γ -Immunopräzipitation nicht co-gereinigt werden. Als Ursache ist einerseits eine instabilere Assoziation beider Proteine denkbar, so dass eine Detektion von PLC γ 1 im Western Blot nicht möglich war, andererseits könnte im Gegensatz zu RBL2H3-Zellen der Ruhestatus der verwendeten Zellen für das Fehlen dieser Interaktion verantwortlich sein. Das heißt, die Interaktion tritt zwar in neutrophilen Granulozyten auf, bildet sich aber erst in Folge uns unbekannter spezifischer Signale aus. Jedoch haben wir in Reaktion auf eine fMLP-Stimulation keine Interaktion zwischen PLC γ 1 und PI3K γ in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen (nicht gezeigte Daten).

Parallel zu dieser Studie wurden in unserer Arbeitsgruppe von Igor Kitanovic verschiedene PKC-Isoformen als PI3K γ -Interaktionspartner in Jurkat-Zellen identifiziert (Kitanovic et al., mündliche Mitteilung). Die Validierung dieser Daten führten zum Nachweis von PKC α als Bindungspartner von PI3K γ in RBL2H3-Zellen und in humanen neutrophilen Granulozyten. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Emilio Hirsch in Turin konnte diese Interaktion auch in Kardiomyozyten von Mäusen nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten). Damit beschränkt sich die Assoziation zwischen PI3K γ und PKC α nicht nur auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Ob die Interaktion in allen PI3K γ -synthetisierenden Zellen auftritt, muss überprüft werden.

Bisher wurde angenommen, dass PKCs von PI3Ks hauptsächlich über die PDK1 reguliert werden, die über Phosphorylierung zur Reifung von PKC-Isoformen beiträgt (Balendran et al., 2000; Le Good et al., 1998). Doch Befunde von Newton belegen, dass gerade die Phosphorylierung von cPKCs durch PDK1 unabhängig von PIP $_3$ ist (Newton, 2003). Eine indirekte Regulierung von PKCs durch PI3Ks ergibt sich aus der beschriebenen PIP $_3$ -abhängigen Aktivierung von PLC γ und der daraus folgenden Produktion von DAG und IP $_3$. Während die direkte Bindung von DAG cPKCs und nPKCs aktiviert, bewirkt IP $_3$ die Freisetzung von intrazellulärem Ca $^{2+}$, das zusätzlich zur Aktivierung von cPKCs benötigt wird. Zu Beginn dieser Arbeit existierten keine Hinweise auf eine direkte wechselseitige Beeinflussung zwischen PI3Ks und PKCs. Vor kurzem konnten Sipeki et al. in vitro die Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit PI3K α durch PKC α nachweisen, die zur Inhibition der Lipidkinaseaktivität von PI3K α führt (Sipeki et al., 2006). Neue Daten von Frey et al. belegen eine in vivo Interaktion zwischen PI3K γ und PKC ζ in Endothelzellen, die sich nicht inhibitorisch auf die Lipidkinaseaktivität von PI3K γ auswirkte, sondern zur ROS-Produktion der Zellen beiträgt (Frey et al., 2006). PI3K γ liegt hier im Signalweg oberhalb von PKC ζ . Diese Arbeiten lassen vermuten, dass funktionell unterschiedliche, isoformspezifische Wechselwirkungen zwischen PI3Ks und PKCs existieren, die möglicherweise Zelltyp-spezifisch auftreten. Daher war

das Ziel unserer Arbeit, die Interaktion zwischen PKC α und PI3K γ näher zu untersuchen und die funktionelle Relevanz zu bestimmen.

5.3 Komplexformation von PI3K γ und PKC α

Aus HEK293-Zellen, die stabil PI3K γ synthetisieren, konnte PI3K γ über die Immunopräzipitation von PKC α co-gereinigt werden. Dies gelang nicht, wenn RBL2H3-Zellen verwendet wurden. Eine mögliche Ursache könnte die starke Abundanz von PKC α in den Zelllysaten sein. Es war nicht möglich, die Gesamtmenge an PKC α durch Immunopräzipitation aus den Zelllysaten zu isolieren. Möglicherweise reichte der Anteil gereinigter PKC α -Moleküle nicht aus, um die Bindung mit PI3K γ nachzuweisen. Mit Hilfe der Blue Native-Gelelektrophorese wurde die Komplexbildung von PI3K γ und PKC α im RBL2H3-Zelllysate untersucht. In unbehandelten RBL2H3-Zellen lagen nur ca. 16 % der Gesamtmenge an PI3K γ komplexiert vor. Dies könnte auf die Verwendung unstimulierter Zellen zurückzuführen sein. PI3K γ wird im Zuge der Migration oder Degranulation von Mastzellen aktiviert (Laffargue et al., 2002; Kitaura et al., 2005). Es ist möglich, dass eine Aktivierung dieser Prozesse die Komplexbildung von PI3K γ steigert. Eine Stimulation von RBL2H3-Zellen mit Adenosin, welches PI3K γ -abhängig Degranulationsprozesse auslöst (Wymann et al., 2003), führte jedoch dazu, dass weniger PI3K γ komplexiert vorlag, als in unbehandelten Zellen (unveröffentlichte Daten). Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass der überwiegende Anteil von PI3K γ in der Zelle als Monomer vorliegt. Es ist denkbar, dass sich PI3K γ -Protein-Wechselwirkungen, die der gezielten Signalweiterleitung dienen, auf kurzfristige, transiente Interaktionen beschränken. Dagegen lagen 85 % der PKC α -Proteine in Komplexen unterschiedlichster Molekulargewichte vor. Dieser Unterschied zu PI3K γ war nicht überraschend. Im Gegensatz zu PI3K γ sind viele verschiedene Proteinbindungspartner für PKCs bekannt (Poole et al., 2004), die entweder als Substrat fungieren oder zur Lokalisierung, Aktivierung oder Stabilität beitragen (s. auch Abschnitt 1.4.6). Besonders die Bindung von PKCs mit Scaffoldproteinen wie AKAPs (Malbon et al., 2004) oder die Interaktion von PKC α mit Caveolin (Jaken and Parker, 2000) können für die gezeigte Komplexbildung von PKC α mit verantwortlich sein. Die Menge an PKC α , die sich im Komplex mit gleichem Molekulargewicht wie PI3K γ befand, war im Verhältnis zur Gesamtmenge gering. Das könnte dazu geführt haben, dass mittels PKC α -Immunopräzipitation nur eine geringe Menge an PI3K γ aus RBL2H3-Zellen co-isoliert wurde, die im Western Blot nicht detektierbar war. Durch die Überproduktion von PI3K γ in den transfizierten HEK293-Zelllinie kam es dagegen wahrscheinlich zu einer unnatürlich starken Bindung an PKC α , so dass hier interagierendes PI3K γ über die gereinigte PKC α -Menge immunologisch nachweisbar war.

5.4 Charakterisierung der PI3K γ -PKC α -Interaktion

Um zu untersuchen, ob eine direkte Wechselwirkung zwischen PI3K γ und PKC α existiert oder dritte Bindungspartner vermitteln, wurde die Interaktion *in vitro* charakterisiert. Aus Sf-9-Insektenzellen gereinigtes rekombinantes His-PI3K γ und GST-PKC α wurden *in vitro* wechselseitig co-gereinigt, was zeigt, dass für die Bindung keine weiteren Proteine, wie beispielsweise die PI3K γ -Adapterproteine p101 oder p87^{PIKAP} benötigt werden. Auch zelluläre Strukturen, wie z.B. eine Membranassoziation, sind für die Ausbildung der Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α nicht essentiell. Damit wurde von uns der bis heute erste Nachweis einer direkten Interaktion zwischen PI3K γ und einer PKC-Isoform erbracht. Es kann davon ausgegangen werden, dass auch unter physiologischen Bedingungen zumindest eine transiente, direkte Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α vorkommt. Die Inhibitoren WM und BIM stimulierten oder inhibierten die Komplexbildung *in vitro* nicht, was aufgrund der relativ geringen Konformationsänderungen durch Bindung der beiden Substanzen nicht überraschend war. Dieses Ergebnis war eine wichtige Grundlage für *in vivo*-Experimente, da Änderungen der zellulären PI3K γ -PKC α -Interaktion durch WM oder BIM somit auf Inhibition der Kinaseaktivität und nicht auf direkte Konformationsänderungen zurückzuführen sind.

5.4.1 Protein-Protein-Interaktionsstudien

Interaktionsstudien in Sf-9-Zellen wurden durchgeführt, um die PKC α -Bindedomäne an PI3K γ einzugrenzen und die Abhängigkeit der Bindung vom Aktivitätsstatus beider Proteine zu überprüfen.

Konstitutiv aktive und eine inaktive PKC α zeigten eine zum Wildtyp-Protein unveränderte Komplexbildung mit PI3K γ . Das heißt, die Autophosphorylierung von PKC α oder eine Transphosphorylierung an PI3K γ , die bei der inaktiven Form fehlen, beeinflussten die Wechselwirkung beider Proteine nicht. Demnach kann PKC α bei geschlossener, höchstens im activation loop phosphorylierter (PKC α_{in}) Konformation, bei geschlossener, aktivierbarer, autophosphorylierter (PKC α_{wt}) Konformation und bei offener, aktiver, vermutlich ebenfalls autophosphorylierter (PKC α_{con}) Konformation an PI3K γ binden (s. Abb. 5.1).

Die Deletionsmutante His-PI3K $\gamma_{\Delta KIDO}$ war genau wie die Wildtypvariante zur Komplexbildung mit PKC α fähig. Somit war auch eine Transphosphorylierung von PKC α durch PI3K γ für die Bindung nicht notwendig. Zusammenfassend ist zu schlussfolgern, dass weder der Aktivitätsstatus von PKC α noch die Kinaseaktivität von PI3K γ als Basis für die Bindung beider Protein angesehen werden kann. Auch His-PI3K $\gamma_{\Delta RBD}$ interagiert mit PKC α . Wie in Tab. 4.2 gezeigt wurde, binden His-PI3K γ_{wt} , His-PI3K $\gamma_{\Delta KIDO}$ und His-PI3K $\gamma_{\Delta RBD}$ mit nahezu gleicher Effizienz GST-PKC α . Aus

diesem Ergebnis können zwei Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum einen kann die Kinase- sowie die RBD-Domäne als Bindeort für PKC α ausgeschlossen werden. Andererseits sind beide Domänen für die Interaktion mit PKC α nicht essentiell. Daraus resultiert, dass sich der PKC α -Bindeort in der C2-Domäne, der helikalen Domäne oder dem N-terminalen Bereich von PI3K γ befindet (Abb. 5.1). Die C2-Domäne von PI3K γ ist an Protein-Lipid-Interaktionen beteiligt (Vanhaesebroeck et al., 2001; Walker et al., 1999). Eine Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen ist vorstellbar, wurde allerdings bisher nur bei C2-Domänen anderer Proteine beobachtet (Sato et al., 2003; Wang et al., 1999). Die helikale Domäne, das strukturelle Rückgrat von PI3K γ , hat aufgrund der festen Assoziation mit den anderen Domänen nur wenige Bereiche, die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zulassen. Von Prasad et al. wurde allerdings eine Interaktion der helikalen Domäne von PI3K γ mit β ARK1 nachgewiesen (Naga Prasad et al., 2005). Das belegt, dass die helikale Domäne zu Protein-Protein-Interaktionen befähigt ist. Die Rolle der N-terminalen Region von PI3K γ bei der Assoziation mit dem Adapter p101 ist etabliert (Krugmann et al., 1999). Dieser Bereich könnte auch an anderen Protein-Protein-Interaktionen, z.B. mit PKC α , beteiligt sein. Um die für die Interaktion entscheidenden Domänen von PI3K γ und PKC α weiter einzugrenzen, könnten in weiterführenden Experimenten die Komplexbildung einzelner Domänen eines Proteins mit dem jeweils anderen gesamten Protein untersucht werden.

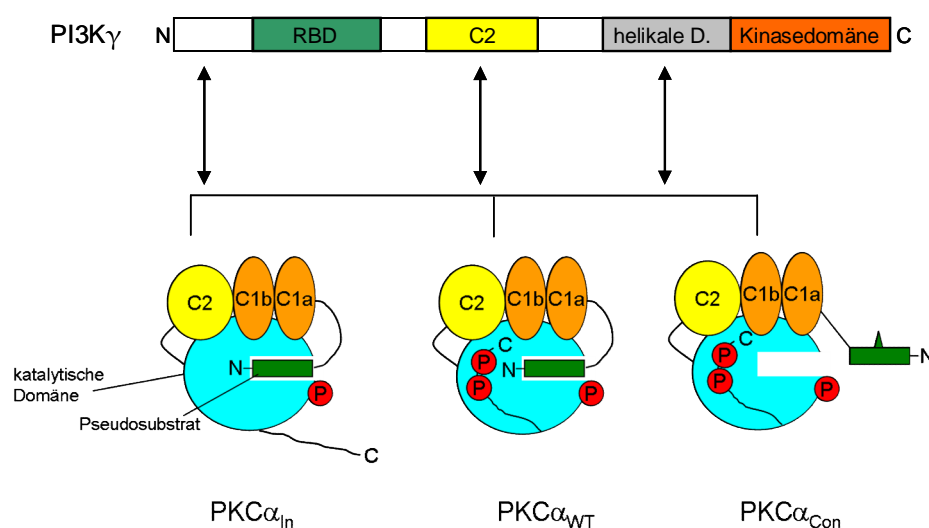


Abb. 5.1: **Interaktion von PI3K γ - mit PKC α -Mutanten** (hypothetisches Schema)

Dargestellt sind die mit PI3K γ interagierenden PKC α -Varianten in ihrer Konformation. Die möglichen Bindedomänen an PI3K γ sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

5.4.2 Transphosphorylierung zwischen PI3K γ und PKC α

Die Unabhängigkeit der Bindung zwischen PI3K γ und PKC α von der Kinaseaktivität beider Proteine, schließt eine Transphosphorylierung der Wildtypformen nicht aus.

Aus diesem Grund wurde mittels in vitro-Kinase-Assays untersucht, ob wechselseitige Phosphorylierungen zwischen PI3K γ und PKC α auftreten. Durch Einsatz spezifischer Inhibitoren und durch Verwendung kinaseinaktiver Mutanten kann festgestellt werden, welches Protein an den Phosphorylierungsreaktionen beteiligt ist.

Für in vitro-Kinase-Assays muss sichergestellt werden, dass die eingesetzten Kinasen aktiv sind. Die Funktionalität der Kinasen wurde durch die beobachtete Autophosphorylierung von PKC α und auch PI3K γ in Abwesenheit anderer Proteine eindeutig belegt (Abb. 4.16). Es bleibt dabei ungeklärt, ob es sich um Autophosphorylierung des gleichen Moleküls oder um eine Transphosphorylierung handelt. Da in unseren Arbeiten GST-PKC α eingesetzt wurde, ist zu beachten, dass Rodriguez et al. vor kurzem GST als Substrat von PKC α in vitro identifizierten (Rodriguez et al., 2005). Durch massenspektrometrische Analyse wurde Serin 93 als PKC α -Phosphorylierungsstelle des GSTs identifiziert. Diese Untersuchungen wurden jedoch nur mit isoliertem GST, nicht mit GST-Epitop-markierten Proteinen durchgeführt. Es ist anzunehmen, dass GST-PKC α das GST-Epitop phosphorylieren kann. Rodriguez et al. gaben keine Hinweise darauf, wie stark die GST-Phosphorylierung im Vergleich zur PKC α -Autophosphorylierung ist. Aus den Daten einer 2D-Gelelektrophorese geht hervor, dass nur ein geringer Anteil des GSTs in phosphorylierter Form vorliegt (Rodriguez et al., 2005). Bei zukünftigen Arbeiten mit GST-Epitop-markierten Proteinkinasen sollte daher das GST-Epitop vor dem Einsatz in Kinase-Assays proteolytisch entfernt werden, um es als Substrat auszuschließen.

Die Phosphorylierung von PKC α war in Anwesenheit von PI3K γ_{WT} stark erhöht. Der PKC-Inhibitor BIM konnte diese Phosphorylierung nur geringfügig senken, während der PI3K-Inhibitor WM eine drastische Reduktion der PKC α -Phosphorylierung bewirkte. Darüber hinaus wurde die PKC α -Phosphorylierung durch die kinaseinaktive PI3K γ_{KR} kaum erhöht. Eine Phosphorylierung von GST durch PI3K γ wurde nicht detektiert. Folglich wurde eindeutig gezeigt, dass PKC α von PI3K γ phosphoryliert wird. Eine Phosphorylierung der inaktiven PKC α durch PI3K γ wurde nicht beobachtet. Da bei PKC α_{In} die beiden C-terminalen Autophosphorylierungen nicht stattfinden, hat das Protein eine andere Konformation als der Wildtyp. Möglicherweise ist die von PI3K γ phosphorylierte Stelle dadurch nicht zugänglich.

5.4.3 Wechselseitige Beeinflussung der Kinaseaktivität

Welche Aminosäuren an PKC α durch PI3K γ phosphoryliert werden, wurde nicht untersucht. Deshalb können keine Rückschlüsse auf die Funktionalität der Phosphorylierung gezogen werden. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung zur Änderung der spezifischen PKC α -Aktivität führt, wurde in vitro-Kinase-Assays durchgeführt, in denen Histone als PKC α -selektives Substrat eingesetzt wurden. PI3K γ ist nicht in der Lage Histone zu phosphorylieren (Foukas et al., 2004), was in dieser Arbeit bestätigt wurde. PKC α dagegen bewirkte eine starke Histon-Phosphorylierung, die sich in Gegenwart von PI3K γ kaum änderte. Die Phosphorylierung von PKC α durch PI3K γ nimmt in vitro also keinen direkten Einfluss auf die spezifische Proteinkinaseaktivität von PKC α . Es ist jedoch möglich, dass die PKC α -Aktivität indirekt beeinflusst wird. Die Phosphorylierung könnte andere Eigenschaften von PKC α wie etwa ihre Stabilität, Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Wechselwirkungen oder ihre subzelluläre Lokalisation regulieren. Die Identifizierung der Phosphorylierungsstelle würde dazu Informationen liefern. Da für PI3K γ bisher ausschließlich eine Serinkinaseaktivität nachgewiesen wurde, wird höchstwahrscheinlich auch bei PKC α ein Serinrest phosphoryliert. Die Autophosphorylierungsstelle am Serin 657 oder die Phorbol ester gesteuerte Phosphorylierung am Serin 260, die zur direkten Aktivierung von PKC α beitragen (Ng et al., 1999), sind eher unwahrscheinlich. Die Phosphorylierungsstelle könnte durch massenspektrometrische Analyse tryptinierter PKC α -Peptide identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis der Phosphorylierung von PKC α durch PI3K γ in vivo nicht erbracht. Daher kann nur spekuliert werden, dass die Phosphorylierung von PKC α durch PI3K γ eine physiologische Funktion besitzt. Die PKC α -Aktivität wurde auch in An- und Abwesenheit von PIP₃ gemessen. Da sich diese nur insignifikant änderte, wurde der Einfluss von PKC α auf die Lipidkinaseaktivität von PI3K γ untersucht. Sie war von der Gegenwart des Proteins unabhängig.

5.5 Untersuchungen zur physiologischen Relevanz der PI3K γ -PKC α -Interaktion in neutrophilen Granulozyten

In Ergänzung zu den in vitro-Studien wurden funktionelle Analysen zur Interaktion beider Proteine in vivo durchgeführt. Dabei haben wir uns auf neutrophile Granulozyten konzentriert. Über extrazelluläre Signale werden unter Einbindung der PI3K γ -Aktivität zelluläre Prozesse zur Abwehr invasiver Mikroorganismen ausgelöst (Hirsch et al., 2000; Li et al., 2000; Hannigan et al., 2002; Chen et al., 2003). Eine funktionelle Charakterisierung der PI3K γ -PKC α -Wechselwirkung

sollte dazu beitragen, die nur lückenhaft bekannte Beteiligung von PI3K γ bei der Regulierung dieser Prozesse näher zu beschreiben.

5.5.1 Effekt der fMLP-Stimulation auf die Wechselwirkung

Eine mögliche Dynamik der Bindung zwischen PKC α und PI3K γ als Folge spezifischer Zellstimulation lässt Rückschlüsse auf die physiologische Relevanz der Protein-Wechselwirkung zu.

Eine fMLP-Stimulation der Zellen führte zu einer transienten, nach 15 - 30 s maximalen Verstärkung der PI3K γ -PKC α -Wechselwirkung. Die Steigerungsrate der Interaktion 30 s nach fMLP-Stimulation war abhängig von der verwendeten fMLP-Konzentration. Die Konzentrationssteigerung von 0,1 μ M auf 1 μ M fMLP korrelierte mit einem Anstieg der Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α . Eine fMLP-Konzentration von 10 μ M bewirkte keine zusätzliche Verstärkung der Interaktion. Dieser Effekt könnte auf die Aktivierung unterschiedlicher Subtypen von fMLP-Rezeptoren zurückzuführen sein. Es existieren zwei Arten von fMLP-Rezeptoren, die fMLP mit unterschiedlicher Affinität binden (Boulay et al., 1990; Murphy et al., 1992). Laut Paclet et al. werden von den Rezeptortypen verschiedene Effektorproteine zur Signalweiterleitung genutzt (Paclet et al., 2004), jedoch sind die genauen rezeptorspezifischen Signalwege bis heute unbekannt. Möglicherweise wird bei fMLP-Konzentrationen bis 1 μ M, die nur von Rezeptoren hoher Affinität erkannt werden, die Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α beeinflusst, während die zusätzliche Aktivierung der Rezeptoren niedriger Affinität ab einer fMLP-Konzentration von 10 μ M die PI3K γ -PKC α -Bindung nicht beeinflusst.

Was sind die molekularen Grundlagen der Interaktionsdynamik? Zwischen 60 – 120 s nach fMLP-Stimulation kam es zur transienten Membranlokalisierung von PI3K γ und auch PKC α . Dieses Ergebnis zeigte, dass beide Proteine in Folge der fMLP-Stimulation aktiviert werden und weist indirekt auf ihre Co-Lokalisierung hin. Es war vorstellbar, dass eine Aktivierung von PI3K γ bzw. PKC α zur Interaktionssteigerung führte. Das fMLP-induzierte Interaktionsmaximum lag allerdings zeitlich vor der detektierten Membranrekrutierung beider Proteine. Die Membrantranslokation von PI3K γ korrelierte nicht mit der aus der Literatur bekannten zeitlichen Aktivierung von PI3K γ . So wurde gezeigt, dass die PI3K γ -abhängige PI(3,4,5) P_3 -Produktion innerhalb weniger Sekunden nach fMLP-Aktivierung einsetzt (Hirsch et al., 2000; Condliffe et al., 2005). Spätere Untersuchungen der O $_2^{\bullet}$ -Produktion wiesen ebenfalls auf eine PI3K γ -Lipidkinaseaktivität wenige Sekunden nach

Zellstimulation hin und bestätigten die Literaturbefunde (s. Abb. 4.23a). Somit ist eine Aktivierung von PI3K γ als Grundlage für die verstärkte Interaktion zu diskutieren.

Die Translokation von PKC α als Reaktion auf fMLP-Stimulation steht in Übereinstimmung zur Resultaten von Selvatici et al., die eine Translokation nach 2 - 5 min beobachteten (Selvatici et al., 2003). Detaillierte Untersuchungen zur spezifischen PKC α -Aktivität nach fMLP-Stimulation existieren nicht.

Es kann spekuliert werden, dass die Bindung zwischen PI3K γ und PKC α infolge der Aktivierung von PI3K γ induziert wird und es daraufhin zur Membranrekrutierung beider Proteine kommt. In diesem Zusammenhang war es interessant zu beobachten, dass spezifische Aktivität von PKC α in vitro in Abwesenheit von Lipiden stark verringert war (unveröffentlichte Daten). Parallel dazu kann eine PI3K γ -unabhängige Aktivierung von PKC α als Ursache der Membrantranslokation diskutiert werden. Nach fMLP-Stimulation werden verschiedene Signalproteine aktiviert. Neben PI3K zählen dazu unter anderem PLD, PLA₂ und PLC (Spisani et al., 2005). G α q-Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine stimulieren speziell PLC- β 2 und PLC- β 3 (Li et al., 2000). Die Aktivierung dieser Proteine führt zur Produktion der second messenger DAG und IP₃, die wiederum cPKCs aktivieren. Die Blockierung der PLC mit spezifischen Inhibitoren vor der fMLP-Stimulation könnte die Frage klären, inwieweit die PKC α -Membrantranslokation auf die Aktivierung durch PLC zuzuführen ist.

5.5.2 Einfluss der PKC α -Aktivierung auf die Interaktion mit PI3K γ

Um den Einfluss der PKC α -Aktivierung auf die Interaktion mit PI3K γ in vivo zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Phorbol ester TPA stimuliert. Die Aktivierung der PKCs konnte durch die Auslösung der O₂[•]-Produktion in neutrophilen Granulozyten bestätigt werden (s. Abb. 4.23b). Die TPA-abhängige ROS-Produktion wurde bisher in mehreren Arbeiten demonstriert. Eine Aktivierung von PI3K γ findet dabei nicht statt (Condliffe et al., 2005; Ding et al., 1995; Sasaki et al., 2000). Im Gegensatz zur maximalen fMLP-induzierten O₂[•]-Produktion wurde eine deutliche zeitliche Verzögerung um nahezu 10 min beobachtet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass TPA nicht rezeptorvermittelt agiert, sondern erst die Zellmembran passieren muss, bevor es durch Diffusion die PKC-Moleküle erreicht. Die Bildung von O₂[•] konnte ab ca. 60 s nach TPA-Zugabe detektiert werden und erreichte ein Maximum nach ca. 10 min, was indirekt auf eine PKC-Aktivierung in diesem Zeitraum hinweist. In der gleichen Zeitspanne konnte keine Änderung der PKC α -PI3K γ -Interaktion festgestellt werden. Somit kann auch in vivo die Aktivierung PKC α als molekulare Grundlage der Wechselwirkung ausgeschlossen werden. So ist auch unwahrscheinlich, dass der fMLP-abhängige Interaktionsverstärkung zwischen PI3K γ und PKC α über PLC β -

induzierte PKC-Aktivität vermittelt wird und PKC α in der Signaltransduktionskaskade oberhalb von PI3K γ einzuordnen ist.

Vermutlich führt die fMLP-induzierte Aktivierung von PKC α zur partiellen Auflösung des vorher ausgebildeten Komplexes mit PI3K γ . Zum Zeitpunkt der fMLP-induzierten, maximalen Membranlokalisierung von PKC α war die Wechselwirkung beider Proteine wieder sehr gering (vgl. Abb. 4.19b und 4.20 Zeitpunkt: 60 und 120 s). Auch in co-transfizierten Sf-9-Zellen führte die TPA-Stimulation zu einer Verringerung der Komplexbildung, die nicht eintrat, wenn die Zellen mit BIM vorbehandelt oder inaktive PKC-Proteine verwendet wurden (Scroblin et al., 2006). Für diese Beobachtungen sind mehrere Ursachen denkbar: eine Konformationsänderung von PKC α infolge der Membranbindung, eine potentielle Phosphorylierung oder auch die Verdrängung von PI3K γ durch PKC-interagierende Proteine.

5.5.3 Zelluläre Reaktionen die zum Anstieg der Komplexbildung zwischen PI3K γ und PKC α führen

Wie bereits erwähnt, führt die fMLP-Stimulation neutrophiler Granulozyten zur Auslösung verschiedener zellulärer Reaktionen (Niggli, 2003). Dabei kommt es unterhalb der fMLP-Rezeptoren zur Verzweigung der Signalwege sowie Aktivierung verschiedener Effektorproteine (Chen et al., 2005; Selvatici et al., 2006). Infolgedessen ergab sich die Frage, in welchen PI3K γ -vermittelten Signalweg die gezeigte Interaktion zwischen PI3K γ und PKC α involviert ist. Da sowohl bei der gerichteten Migration als auch bei der ROS-Produktion die Aktivierung von cPKCs nachgewiesen wurde, haben wir beide Signalwege in Betracht gezogen. Es ist vorstellbar, dass PI3K γ oder einzelne PKC-Isoformen über reaktionsspezifische Interaktionen mit bestimmten Signalproteinen zur differentiellen Weiterleitung der fMLP-Signale beitragen. Beispielsweise konnte durch den Einsatz von fMLP-Analoga, die distinkte, zelluläre Prozesse hervorrufen, eine selektive Aktivierung von PKC α , PKC β II und PKC ζ im Rahmen der ROS-Produktion und von PKC β I im Zuge der Migration beobachtet werden (Selvatici et al., 2003; Spisani et al., 2005). Basierend auf diesen Daten wurde vermutet, dass die PI3K γ -PKC α -Wechselwirkung funktionell an Signalwegen, die zur ROS-Produktion führen, beteiligt ist. Da uns zur Überprüfung dieser Hypothese keine funktionsspezifischen fMLP-Analoga zur Verfügung standen, wurde die Komplexbildung von PI3K γ und PKC α infolge der Zellstimulation durch IL-8 überprüft. IL-8 löst analog zu fMLP PI3K γ -abhängig die Migration neutrophiler Granulozyten aus (Fuhler et al., 2005; Knall et al., 1997). IL-8 ist aber selbst nicht in der Lage, die NADPH-Oxidase zu aktivieren (Guichard et al., 2005). Da keine O $_2^{\bullet-}$ -Produktion in IL-8 stimulierten Zellen detektierbar war, konnte dies von uns bestätigt werden. Es ist bekannt, dass die IL-8-Stimulation neutrophiler

Granulozyten zur Phosphorylierung von ERK führt (Van Lint et al., 1993). Da dies von uns bestätigt wurde (unveröffentlichte Daten), war die eingesetzte IL-8-Konzentration (100 ng/ml) funktionell. Im Gegensatz zur fMLP-Stimulation bewirkte die IL-8-Stimulation der Zellen keinen Anstieg der PKC α -PI3K γ -Komplexbildung (vgl. Abb. 4.19a und 4.22). Vielmehr wurde im untersuchten Zeitraum eine leichte Abnahme der Interaktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Interaktion keine funktionelle Bedeutung bei der Migration neutrophiler Granulozyten besitzt. Die Auflösung des PI3K γ -PKC α -Komplexes kann darauf zurückzuführen sein, dass PI3K γ in PKC α -unabhängige Signalwege eingebunden und dadurch dem gemeinsamen Komplex entzogen wird.

5.5.4 Auswirkung der PI3K γ -Inhibition auf die PI3K γ -PKC α -Interaktion

Der regulatorische Einfluss von PI3K γ auf die ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten wurde bis jetzt fast ausschließlich der Lipidkinaseaktivität des Enzyms zugewiesen (Chen et al., 2003; Yamamori et al., 2004; Ellson et al., 2001; Kanai et al., 2001). Ein Beitrag der Proteinkinaseaktivität oder spezifischer Protein-Protein-Wechselwirkungen zur Regulierung der ROS-Produktion wurde bis jetzt für diesen Zelltyp nicht diskutiert. Nur die von Frey et al. gezeigte Interaktion zwischen PI3K γ und PKC ζ in Endothelzellen gibt einen Hinweis auf eine alternative Wirkungsweise von PI3K γ (Frey et al., 2006). Die migrationsunabhängige fMLP-induzierte Komplexbildung zwischen PI3K γ und PKC α in neutrophilen Granulozyten und die in vitro nachgewiesene Phosphorylierung von PKC α durch PI3K γ sind ein Hinweis auf eine funktionelle Bedeutung der PI3K γ -Proteinkinaseaktivität bei der Regulierung der ROS-Produktion.

Neutrophile Granulozyten, die mit 10 μ M des spezifischen PI3K γ -Inhibitor AS242525 vorbehandelt wurden, reagierten mit einer 60-%igen Reduktion der fMLP-induzierten O $_2^{\bullet}$ -Produktion. Damit wird deutlich, dass die Kinaseaktivität von PI3K γ eine bedeutende Rolle bei der Auslösung der O $_2^{\bullet}$ -Produktion in humanen neutrophilen Granulozyten spielt. Die Wirkungsweise von AS252424 beruht auf der kompetitiven Hemmung der ATP-Bindung, womit die Blockade der Protein- als auch die Lipidkinaseaktivität von PI3K γ erreicht wird. Unsere Daten stimmen mit Ergebnissen von Condliffe et al. überein, die bei gleicher AS252424-Konzentration in TNF α -vorbehandelten Zellen eine Reduktion der fMLP-induzierten O $_2^{\bullet}$ -Produktion um ca. 65 % beobachteten (Condliffe et al., 2005). Zwar liegt der in vitro bestimmte IC-50 Wert von AS252424 mit 0,035 μ M weit unter den von uns eingesetzten Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M, jedoch geben Condliffe et al. an, dass AS252424 nur ineffizient in die Zellen diffundiert (Condliffe et al., 2005). Neutrophile Granulozyten, die mit AS252424 vorbehandelt wurden, reagierten ebenso wie unbehandelte Zellen mit einem fMLP-induzierten Anstieg der PI3K γ -PKC α -Interaktion. Dieses Ergebnis konnte auch in

WM-behandelten neutrophilen Granulozyten reproduziert werden (unveröffentlichte Daten). Das beweist, dass es sich bei der fMLP-induzierten Komplexbildung zwischen PI3K γ und PKC α um einen von der PI3K γ -Kinaseaktivität unabhängigen Vorgang handelt. Dieser Befund wird durch die oben beschriebenen in vitro- Daten unterstützt, die eine Bindung zwischen PKC α und kinaseinaktivem PI3K γ_{K100} zeigen. Dieser Befund schließt aber nicht aus, dass die Proteinkinaseaktivität von PI3K γ für die Signalweiterleitung nach der Komplexbildung benötigt wird. So besteht die Möglichkeit, dass die Bindung zu PKC α unabhängig von der PI3K γ -Aktivität erfolgt, eine potentielle Signalintegration in Form der PKC α -Phosphorylierung dann aber blockiert ist. Welche Faktoren die fMLP-induzierte Steigerung der Interaktion bewirken, kann nicht beantwortet werden. Obwohl in vitro keine PI3K γ -Adapterproteine für die PI3K γ -PKC α -Interaktion essentiell sind, könnten diese in vivo zur fMLP-induzierten Komplexbildung beitragen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Signalweiterleitung über eine kinaseunabhängige Protein-Protein-Interaktion. Die Bindung zwischen PDE3B und PI3K γ in Herzmuskelzellen führt nach Patrucco et al. zu einer PI3K γ -kinaseunabhängigen Beeinflussung der PDE3B-Aktivität (Patrucco et al., 2004). Zwar wurde in vitro kein Einfluss von PI3K γ auf die Aktivität von PKC α nachgewiesen, doch wie im Abschnitt 5.4.3 diskutiert, könnte die Bindung von PI3K γ einen indirekten regulatorischen Einfluss auf die PKC α -Aktivität haben, der durch in vitro-Experimente nicht dargestellt werden kann. Bei PI3K $\gamma^{-/-}$ -Mäusen kommt es zum nahezu vollständigen Verlust der fMLP-induzierten ROS-Produktion (Hirsch et al., 2000; Sasaki et al., 2000). Auch die pharmakologische Inhibierung von PI3K γ mit 100 nM WM blockiert fast vollständig die ROS-Produktion in humanen neutrophilen Granulozyten (Chen et al., 2002). Dies wurde von uns bestätigt (nicht gezeigte Daten). Hierbei muss jedoch bemerkt werden, dass WM in vitro die spezifische PKC α -Aktivität um mehr als 20 % senkte (s. Abb. 4.17), was zusätzlich zur Reduzierung der ROS-Produktion beitragen kann. Wie Condliffe et al., konnten auch wir unter Verwendung des spezifischen PI3K γ -Inhibitors AS252424 (10 μ M) keine 100-%ige Inhibition der O $_2^{\bullet-}$ -Produktion erzielen. Ursache dafür könnte sein, dass 1. PI3K γ unvollständig inhibiert wurde, 2. andere Signalproteine, wie beispielsweise Klasse IA PI3Ks, parallel von PI3K γ wirken oder 3. inaktive PI3K γ über die diskutierte Protein-Protein-Interaktion zur detektierten O $_2^{\bullet-}$ -Produktion beiträgt.

Naga Prasad et al., haben beschrieben, dass bei der Agonist-induzierte Internalisierung β -adrenerger Rezeptoren (β AR) drei verschiedene PI3K γ -Funktionen wirken. Eine reine PI3K γ -Protein-Interaktion wird für diesen Prozess ebenso benötigt wie die Lipid- und die Proteinkinaseaktivität des Enzyms (Naga Prasad et al., 2005). Auch wenn die genaue Funktion der PI3K γ -PKC α -Interaktion an dieser Stelle ungeklärt bleibt, so deuten unsere Daten darauf hin, dass auch zur PI3K γ -abhängigen Regulierung der ROS-Produktion nicht nur die Lipidkinaseaktivität

des Enzyms beiträgt, sondern auch die Protein-Protein-Interaktion mit PKC α und möglicherweise die Proteinkinaseaktivität von PI3K γ eine Rolle spielt.

5.5.5 Zytosolische Komponenten der NADPH-Oxidase als Bindungspartner von PI3K γ

Die These, dass die fMLP-induzierte PI3K γ -PKC α -Komplexbildung funktionell in die Regulierung der ROS-Produktion eingebunden ist, wurde durch die Identifizierung von p47^{phox} als weitere Komponente im gemeinsamen Proteinkomplex mit PI3K γ und PKC α unterstützt. Ob eine direkte Bindung zwischen PI3K γ und p47^{phox} besteht oder die Interaktion über andere Proteine, wie beispielsweise PKC α vermittelt wird, wurde nicht untersucht. In vitro-Interaktionsstudien zwischen PI3K γ und p47^{phox} oder PKC α und p47^{phox} wären eine Möglichkeit, diese Frage zu klären. Beide Proteine weisen ca. 15 – 30 s nach Beginn der fMLP-Stimulation einen transienten Anstieg der Interaktion zu PI3K γ auf. Die analoge Bindungsdynamik infolge der fMLP-Stimulation belegt, dass die Interaktion zu p47^{phox} in engem Zusammenhang zur PKC α -Bindung steht. Sowohl in vitro als auch in vivo wurde gezeigt, dass PKCs über die Aktivierung von p47^{phox} zur Stimulation der NADPH-Oxidase beitragen (Reeves et al., 2000; Dang et al., 2001; Fontayne et al., 2002; Frey et al., 2006). Fontayne et al., demonstrierten in vitro die mehrfache Serin-Phosphorylierung von p47^{phox} durch PKC-Isoformen, darunter auch PKC α (Fontayne et al., 2002). In Monozyten konnte durch selektive Isoform-Blockierung PKC α als Regulator der O₂[•]-Produktion identifiziert werden (Li et al., 1999). In Tiermodellen (Mäusen) könnte die selektive Gen-Suppression helfen, auch in neutrophilen Granulozyten den Einfluss einzelner PKC-Isoformen auf die ROS-Produktion zu bestimmen.

Es kann spekuliert werden, dass die Komplexbildung zwischen PI3K γ , PKC α und p47^{phox} die Phosphorylierung von p47^{phox} durch PKC α begünstigt und damit einen stimulatorischen Einfluss auf die Aktivierung der NADPH-Oxidase ausübt. Nach Fontayne et al. hat unter den PKCs, die in neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, PKC α die geringste Affinität zu p47^{phox} (Fontayne et al. 2002). Möglicherweise besteht die Funktion von PI3K γ im Multiproteinkomplex darin, die Bindungspartner in unmittelbare räumliche Nähe zu bringen und somit die Bindung von PKC α und die darauf folgende Phosphorylierung von p47^{phox} zu forcieren. Um die Phosphorylierung von p47^{phox} zu untersuchen, wurden die komplexierten p47^{phox}-Moleküle mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphorylierte Serinreste analysiert. Da diese nicht nachgewiesen werden konnte, kann geschlussfolgert werden, dass zu diesem frühen Zeitpunkt der Komplexbildung die im Komplex vorliegenden p47^{phox}-Moleküle noch nicht hyperphosphoryliert sind. Jedoch war auch im Gesamtzelllysat nur eine geringe Serinphosphorylierung von p47^{phox} in Reaktion auf die

fMLP-Stimulation zu beobachten. Damit ist nicht ausgeschlossen, dass der Nachweis von phosphoryliertem p47^{phox} im Komplex ineffizient war.

In Folge der Phosphorylierung bestimmter Serinreste von p47^{phox}, die auch PKC-Substrate sind, kommt es zu Konformationsänderung des Proteins. Das ermöglicht die Bindung von p47^{phox} an die Membran und andere Proteinkomponenten der NADPH-Oxidase (Quinn and Gauss, 2004). Dies kann analog zu PKC α als Ursache für die Dissoziation des PI3K γ -p47^{phox}-Komplexes zum Zeitpunkt maximaler O₂[•]-Produktion diskutiert werden.

Um die Frage zu klären, ob weitere zytosolische Komponenten der NADPH-Oxidase in den Multiproteinkomplex mit PI3K γ , PKC α und p47^{phox} eingebunden sind, wurde zuerst untersucht ob sich p67^{phox} im PI3K γ -assoziierten Komplex befindet. Obwohl p67^{phox} sowohl in ruhenden als auch in aktivierten neutrophilen Granulozyten an p47^{phox} bindet (Iyer et al., 1994; Lapouge et al., 2002), konnte dieses Protein nicht im PI3K γ -Immunopräzipitat nachgewiesen werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass ausschließlich p47^{phox} mit PI3K γ und PKC α assoziiert ist und gebundenes p47^{phox} keine weitere Bindung zu p67^{phox} eingeht. Es gibt Hinweise darauf, dass p47^{phox} auch als Monomer im Zytosol vorliegt und nach Aktivierung der Zellen selbstständig ohne Bindung weiterer NADPH-Komponenten zur Membran migrieren kann (El Benna et al., 1994; Iyer et al., 1994). Vermutlich kommt es infolge der fMLP-Stimulation zur Komplexbildung zwischen PI3K γ , PKC α und inaktivem, ungebundenem p47^{phox}. Es kann vermutet werden, dass nachfolgend aktiviertes p47^{phox}, analog zu PKC α , den Komplex verlässt, um erst dann mit weiteren Mitgliedern der NADPH-Oxidase den aktiven NADPH-Oxidase-Enzymkomplex zu bilden. Im Gesamtzelllysat jedoch wurde für p67^{phox} nur schwaches Signal detektiert. Das steht in Übereinstimmung zu Literaturdaten, die zeigen, dass p67^{phox} in Granulozyten nur in geringer Konzentration vorliegt und zudem sehr schnell proteolysiert wird (Erickson et al., 1992; Leto et al., 1991). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass potentiell co-gereinigtes p67^{phox}-Protein vorhanden war, im Western Blot aber unter der Nachweisgrenze lag.

Rac2 ist ebenfalls eine zytosolische Komponente der NADPH-Oxidase, die aber in ruhenden Zellen keinen Komplex mit anderen Mitgliedern der NADPH-Oxidase bildet (Quinn and Gauss, 2004). Rac2 konnte nicht als Bestandteil des von uns identifizierten PI3K γ -assoziierten Komplexes nachgewiesen werden. Das lässt sich dadurch erklären, dass Rac2 nach Zellaktivierung selbstständig und unabhängig von p47^{phox} zur Membran migriert (Dorseuil et al., 1995). Eine Interaktion erfolgt lediglich nach Zellaktivierung und dann nur mit p67^{phox} und nicht mit p47^{phox} (Babior, 1999; Diekmann et al., 1994). Eine Komplexbindung von Rac2 mit Komponenten der NADPH-Oxidase ist demnach nur an der Membran zu erwarten und würde erst nach der

Aktivierung von p47^{phox} auftreten. Unsere Ergebnisse weisen aber darauf hin, dass sich der Komplex vor Aktivierung der NADPH-Oxidase bildet und zum Zeitpunkt der ROS-Produktion partiell wieder auflöst. Dafür spricht auch die von uns gezeigte frühe Komplexbildung zwischen den Signalproteinen, die zum Zeitpunkt der maximalen O₂[•]-Produktion wieder abnimmt (vgl. Abb. 4.19a u. 4.26 mit Abb. 4.23a). Vermutlich hat die PI3K γ -PKC α -p47^{phox}-Interaktion eine Priming-Funktion in Bezug auf die Aktivierung der ROS-Produktion und trägt zur schnellen zellulären Reaktion bei.

5.5.6 Modell der PI3K γ abhängigen Regulierung der ROS-Produktion

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass die fMLP-induzierte Komplexbildung zwischen PI3K γ , PKC α und p47^{phox} in Signalwege eingebunden ist, die zur ROS-Produktion führen. Damit kann das von Chen et al., 2003 aufgestellte Modell, indem PI3K γ und PKCs über völlig unabhängige Signalwege zur Induktion der ROS-Produktion beitragen, widerlegt werden. Durch die PI3K γ -PKC α -Interaktion kommt es wahrscheinlich zu einer Einbeziehung der PKC-Aktivität in PI3K γ -regulierte Signalwege. Ob dabei PI3K γ über die in vitro gezeigte Proteinkinaseaktivität oder über eine kinaseunabhängige Protein-Interaktion zur Signalintegration beiträgt, wurde in vivo nicht geklärt. Dennoch kann das existierende Modell zur Regulierung der PI3K γ -abhängigen ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten, bei dem hauptsächlich die Lipidkinaseaktivität des Enzyms in den Vordergrund gestellt wird, um einen alternativen Wirkungsmechanismus der PI3K γ ergänzt werden. Die Komplexbildung von PI3K γ mit PKC α und p47^{phox} wirkt sich vermutlich verstärkend und stabilisierend auf die PKC α -p47^{phox}-Bindung aus und stimuliert somit die PKC α -abhängigen Aktivierung von p47^{phox}. Die Komplexbildung bedingt die räumliche Nähe der Interaktionspartner, die eine unmittelbare und effiziente Reaktion der neutrophilen Granulozyten auf die fMLP-Stimulation vermittelt.

Basierend auf unseren Ergebnissen und vorangegangenen Studien schlagen wir das in Abb. 5.2 dargestellte Modell zur PI3K γ -abhängigen Regulierung der fMLP-induzierten ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten vor: Die Bindung von fMLP an seine G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt zur Aktivierung von PI3K γ auf dessen Höhe die eingegangenen Signale integriert und differentielle Signalwege aktiviert werden. Die Lipidkinaseaktivität resultiert in der Produktion von 3-Phosphoinositiden, welche direkt im Fall von PI(3,4)P₂ oder über das PI(3,4,5)P₃-Effektorprotein Akt indirekt zur Aktivierung von p47^{phox} beisteuern (Kanai et al., 2001; Hoyal et al., 2003; Chen et al., 2003). Darüber hinaus ist eine PI3K γ -abhängige Aktivierung von ERK möglich, welches ebenfalls zur p47^{phox}-Phosphorylierung in der Lage ist (El Benna et al., 1996; Chen et al., 2005). Parallel dazu stimuliert die PI3K γ -PKC α -p47^{phox}-Komplexbildung Signalweiterleitung zur

Aktivierung von $p47^{\text{phox}}$. Die daraus resultierende mehrfache Aktivierung von $p47^{\text{phox}}$ führt zur Bildung der aktiven NADPH-Oxidase und zur Initiierung der $\text{PI3K}\gamma$ -abhängigen ROS-Produktion.

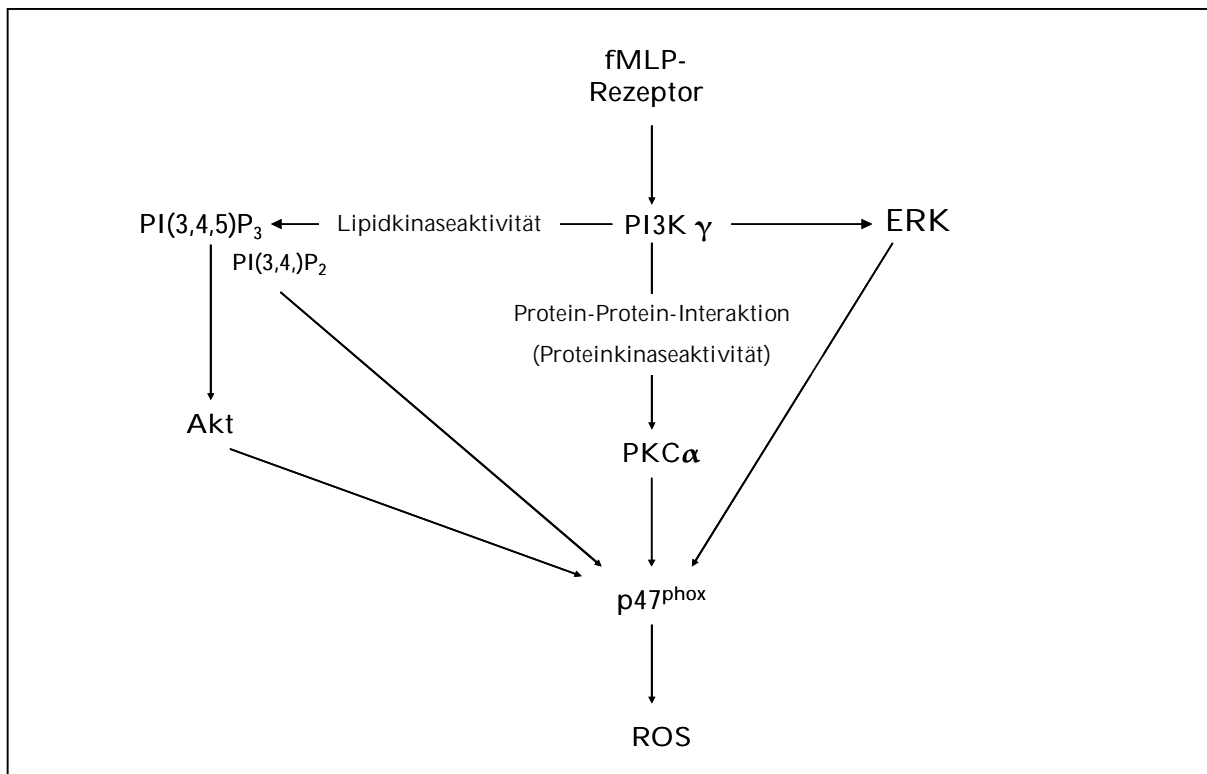


Abb. 5.2: Modell der $\text{PI3K}\gamma$ -abhängigen Regulierung der ROS-Produktion

Die Stimulation der fMLP-Rezeptoren führt zur Aktivierung von $\text{PI3K}\gamma$, welches daraufhin über parallele Signalwege die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von $p47^{\text{phox}}$ vermittelt.

5.5.7 Zweite Phase der $\text{PI3K}\gamma$ - $\text{PKC}\alpha$ - $p47^{\text{phox}}$ -Komplexbildung nach fMLP-Stimulation

Überraschender Weise konnten wir 5 - 7 min nach fMLP-Stimulation eine zweite Phase der Interaktionsverstärkung zwischen $\text{PI3K}\gamma$, $\text{PKC}\alpha$ und auch $p47^{\text{phox}}$ nachweisen. Im Gegensatz zur Interaktionsteigerung nach ca. 30 s war diese Komplexbildung von der $\text{PI3K}\gamma$ -Aktivität abhängig und konnte durch Vorbehandlung der Zellen mit WM unterdrückt werden. Welche funktionelle Bedeutung für diese Interaktion in Frage kommt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Es kann spekuliert werden, dass es eine negative Rückkopplung gibt, die zur Beendigung der ROS-Produktion führt. Es wird angenommen, dass eine Hyperphosphorylierung von $p47^{\text{phox}}$ durch $\text{PKC}\alpha$, $\text{PKC}\beta\text{II}$ und $\text{PKC}\delta$ auch inhibitorisch wirken kann. Möglicherweise kommt es durch ein unbekanntes Signal zur späten Komplexbildung und damit zur Initiierung weiterer Phosphorylierungen am $p47^{\text{phox}}$, welches daraufhin deaktiviert wird. Diese These muss jedoch durch weiterführende Experimente hinterfragt werden.

5.5.8 Interaktion von PI3K γ mit weiteren PKC-Isoformen

Bisher konnte in neutrophilen Granulozyten außer PKC α auch PKC β I, PKC β II, PKC δ und PKC ζ nachgewiesen werden (Spisani et al., 2006). Wir haben untersucht, ob neben PKC α auch weitere PKC-Isoformen mit PI3K γ interagieren. Dabei konnte PKC β II als weiterer möglicher Bindungspartner von PI3K γ in neutrophilen Granulozyten identifiziert werden. Zwar wurde auch ein Signal für co-gereinigte PKC β I detektiert, doch wurde eine Kreuzreaktivität des PKC β I-Antikörper mit gereinigtem, rekombinantem His-PKC α festgestellt. Da uns keine rekombinanten Proteine der anderen PKC-Isoformen zur Verfügung standen, war eine direkte Validierung der Antikörper-Spezifität nicht möglich. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass co-gereinigtes PKC α statt PKC β I im Western Blot detektiert wurde. Die Interaktion zwischen PI3K γ und PKC β II konnte von Igor Kitanovic bereits in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden (Kitanovic et al., unveröffentlichte Daten). In RBL2H3-Zellen dagegen wurde diese Wechselwirkung von uns nicht gefunden. Damit wird deutlich, dass es Zelltyp-spezifische Interaktionen zwischen PI3K γ und PKC-Isoformen gibt, deren genauen Funktionen in weiteren Studien untersucht werden müssen. Über die Funktion der PI3K γ -PKC β II-Wechselwirkung in neutrophilen Granulozyten kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, da diese in der vorliegenden Studie noch nicht näher untersucht wurde. Analog zu PKC α wurde ein schneller, transienter Anstieg der Interaktion zu PI3K γ nach fMLP-Stimulation beobachtet. Demzufolge kann vermutet werden, dass funktionelle Überschneidungen existieren.

Die in Endothelzellen identifizierte Interaktion zwischen PI3K γ und PKC ζ , welche dort im Zusammenhang mit der ROS-Produktion auftritt, konnte von uns in neutrophilen Granulozyten nicht gezeigt werden. Wahrscheinlich existieren Zelltyp-spezifisch funktionelle Unterschiede der PKC ζ -Aktivität. Es gibt widersprüchliche Daten darüber, ob PKC ζ eine Rolle bei der ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten spielt (s. Abschnitt 1.4.7.2). Fontayne et al. belegen, dass PKC ζ weniger Serinreste am p47^{phox} phosphoryliert als PKC α , PKC β II und PKC δ . Dennoch weist PKC ζ die mit Abstand größte Affinität zu p47^{phox} und die stärkste stimulatorische Wirkung auf die NADPH-Oxidase auf (Fontayne et al., 2002). Basierend auf diesen Ergebnissen werden unterschiedliche Funktionen einzelner PKC-Isoformen bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase in Betracht gezogen. Auch eine Interaktion zwischen PI3K γ und PKC δ wurde von uns nicht gefunden. Eine Beteiligung an der ROS-Produktion von PKC δ konnte in HL-60 Zellen gezeigt werden. Doch während die Inhibition von cPKCs in dieser Studie sowohl die O₂⁻-Produktion als auch die Aktivierung von p47^{phox} reduzierte, hatte die Inhibition von PKC δ keinen Einfluss auf die Aktivierung von p47^{phox} (Waki et al., 2006). Reeves et al. konnten zeigen, dass PKC β und PKC δ in neutrophilen Granulozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation mit p47^{phox} interagieren (Reeves et al., 2000). Diese Resultate weisen daraufhin, dass PKC ζ und PKC δ die

NADPH-Oxidase in neutrophilen Granulozyten über einen alternativen Signalweg regulieren und würden erklären, warum von uns nur für PKC α und PKC β I, nicht aber für PKC δ bzw. PKC ζ eine Komplexbildung mit PI3K γ und p47^{phox} nachgewiesen wurde. Da die detektierten Konzentrationen von PKC ζ und im PKC δ Gesamtzelllysat neutrophiler Granulozyten sehr gering war, ist es jedoch auch möglich, dass zu wenige Moleküle über PI3K γ co-gereinigt wurden, um sie im Western Blot identifizieren zu können.

Unsere Untersuchungen bestätigen in Übereinstimmung mit bisherigen Kenntnissen zu PI3K γ -PKC-Wechselwirkungen, dass es Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Komplexbildung von PI3K γ und verschiedenen PKC-Isoformen gibt. Eine Zusammenfassung der bisher bekannten PI3K γ -PKC-Interaktionen ist in Tab. 5.1 dargestellt. Welche Funktionen die einzelnen Wechselwirkungen ausüben, ist weitgehend unbekannt und muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

Zelltyp	PKC-Isoform	Interaktion	Nachweis über:	Quelle
humane neutrophile Granulozyten	PKC α PKC β II PKC β I PKC δ PKC ζ	ja ja ? nein nein	PI3K γ -IP	diese Arbeit
RBL2H3-Zellen	PKC α PKC β I	ja nein	PI3K γ -IP	diese Arbeit
Kardiomyozyten	PKC α	ja	GST-Pull-Down mit GST-PI3K γ ; PI3K γ -IP	Lehmann in Kooperation mit Hirsch et al. unveröffentlichte Daten
Endothelzellen	PKC ζ	ja	PI3K γ -IP	Frey et al., 2006
Mastzellen	PKC β	ja	PI3K γ -IP	Wymann et al. unveröffentlichte Daten
Jurkat-Zellen	PKC α PKC β II PKC β I PKC ζ	ja ja ja ja	PI3K γ -IP	Kitanovic et al. unveröffentlichte Daten
humane CD4 ⁺ -T-Zellen	PKC α PKC β II	nein nein	PI3K γ -IP	Kitanovic et al. unveröffentlichte Daten
Neuroblastomazellen	PKC α	nein	PI3K γ -IP	Scroblin unveröffentlichte Daten

Tab. 5.1: Übersicht über Zelltyp-spezifische Interaktionen von PI3K γ mit verschiedenen PKC-Isoformen

5.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in neutrophilen Granulozyten ein Multiproteinkomplex identifiziert, der PI3K γ , PKC α und p47^{phox} umfasst und nach fMLP-Stimulation funktionell in die Regulierung der ROS-Produktion eingebunden ist. Zukünftige Experimente sollten nun der weiterführenden Aufklärung der physiologischen Bedeutung dieses Proteinkomplexes dienen. Von besonderem Interesse ist hierbei die potentielle Beteiligung von PI3K γ -Adapterproteinen bei der Komplexbildung und die Auswirkung von PI3K γ auf die ROS-Produktion in Abwesenheit der identifizierten PKC-Bindungspartner.

Darüber hinaus bietet die Identifizierung weiterer Zelltyp-spezifischer Interaktionspartner, wie PLC γ 1 oder verschiedener PKC-Isoformen, interessante Ansatzpunkte für zukünftige funktionelle Untersuchungen PI3K γ -vermittelter Signaltransduktion auch in anderen Zelltypen.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit konnte ein weiterer Beweis für die Multifunktionalität des Signalproteins PI3K γ bei der Regulierung einzelner zellulärer Prozesse erbracht werden. Tendenziell zeichnet sich ab, dass die Proteinkinaseaktivität oder kinaseunabhängigen Protein-Interaktionen von PI3K γ eine weit größere Bedeutung haben als bisher vermutet.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit widmet sich der Identifizierung und Charakterisierung neuer Bindungspartner von PI3K γ . Zur Isolation PI3K γ -assoziierter Komplexe wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze verwendet. Der Einsatz Epitop-markierter Fusionsproteine von PI3K γ erwies als ungeeignet, da zum einen die stabile Expression und zum anderen die quantitative Reinigung nicht erreicht wurden. Mittels PI3K γ -Immunopräzipitation ist es gelungen, natürliche PI3K γ -assozierte Proteinkomplexe zu isolieren. Deren massenspektrometrische und immunologische Analyse führte zur Identifizierung neuer PI3K γ -Bindungspartner wie PLC γ 1 oder PKC α in RBL2H3-Zellen. Die Assoziation zwischen PI3K γ und PKC α konnte zudem in humanen neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden.

Der erste Nachweis einer direkten Interaktion zwischen PI3K γ und einer PKC-Isoform, wurde durch die Validierung der PI3K γ -PKC α -Wechselwirkung *in vitro* erbracht. Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass PI3K γ *in vitro* PKC α phosphorylieren kann. Es konnte jedoch kein Einfluss auf die spezifische PKC α -Aktivität gefunden werden. Damit bleibt die Rolle der physiologischen Relevanz der Phosphorylierung vorerst ungeklärt. Aufschluss könnte die Identifizierung der Phosphorylierungsstelle an PKC α und die Validierung der Phosphorylierung *in vivo* bringen.

Mittels PI3K γ -Deletionsmutanten wurde gezeigt, dass weder die RBD- noch die Kinasedomäne von PI3K γ für die Proteininteraktion mit PKC α essentiell sind. Damit wird eine Beteiligung der helikalen Domäne, der C2-Domäne oder der N-terminalen Region wahrscheinlich. Der PKC α -Aktivitätsstatus war für die Interaktion zu PI3K γ nicht ausschlaggebend. PKC α bindet sowohl in konstitutiv aktiver als auch in inaktiver Konformation unverändert an PI3K γ .

In vivo-Untersuchungen in neutrophilen Granulozyten lieferten erste Hinweise zur physiologischen Relevanz der PI3K γ -PKC α -Interaktion. Stimulation der Zellen mit dem Chemotaxin fMLP bewirkt innerhalb von 30 s einen transienten Anstieg der PI3K γ -PKC α -Interaktion. Sowohl PI3K γ als auch PKC α werden infolge der fMLP-Stimulation aktiviert. Die Komplexbildung kann jedoch nicht auf die PKC α -Aktivierung zurückgeführt werden. Somit ist die fMLP-induzierte Aktivierung von PI3K γ als molekulare Ursache der Interaktionssteigerung wahrscheinlich. Überraschenderweise ist die fMLP-induzierte PI3K γ -PKC α -Komplexbildung, von der PI3K γ -Kinaseaktivität unabhängig. Weitergehende Rückschlüsse über den genauen Mechanismus der potentiellen Signalweiterleitung konnten nicht gezogen werden. PI3K γ -Adapterproteine könnten zur Komplexbildung beitragen. Weiterhin kann eine funktionelle kinaseunabhängige Protein-Protein-Interaktion, wie sie für PI3K γ und PDE3B in Kardiomyozyten gezeigt wurde, in Betracht gezogen werden.

Ausgehend von diesen Beobachtungen stellte sich die Frage, für welche zelluläre Reaktion die PI3K γ -PKC α -Wechselwirkung eine physiologische Relevanz hat. Bekanntermaßen trägt PI3K γ in fMLP-stimulierten neutrophilen Granulozyten zur Regulierung von Migration und ROS-Produktion bei. Die gezielte Stimulation PI3K γ -abhängiger Migration durch IL-8 führte nicht zur PI3K γ -PKC α -Komplexbildung. Daraus kann geschlossen werden, dass die Komplexbildung funktionell in die Kontrolle der fMLP-induzierten ROS-Produktion, nicht aber Migrationsprozesse eingebunden ist.

In Bestätigung zu oben genannter These wurde in fMLP-stimulierten Zellen zusätzlich p47^{phox}, eine Komponente der NADPH-Oxidase, als weiterer Bindungspartner des PI3K γ -assoziierten Proteinkomplexes identifiziert. Dabei zeigte p47^{phox} eine zu PKC α analoge Bindungsdynamik. Weiterführende Experimente müssen klären, ob hierbei eine direkte Bindung zu PI3K γ vorliegt oder die Interaktion möglicherweise über PKC α vermittelt wird. Möglicherweise beeinflusst die Komplexbildung mit PI3K γ die PKC α -abhängige Aktivierung von p47^{phox}. Rac2 oder p67^{phox}, zwei weitere zytosolische Komponenten der NADPH-Oxidase, wurden im PI3K γ -Immunopräzipitat nicht gefunden.

Neben PKC α scheint PKC β II jedoch nicht PKC ζ oder PKC δ in neutrophilen Granulozyten Bestandteil des fMLP-induzierten Multiproteinkomplexes mit PI3K γ und p47^{phox} zu sein.

Es bedarf vertiefender Untersuchungen, um die funktionelle Relevanz des PI3K γ -assoziierten Multiproteinkomplexes vollständig aufzuklären. Entgegen bisheriger Vorstellungen, konnte gezeigt werden, dass es durch direkte Interaktionen zu Überschneidungen der PI3K γ - und PKC-abhängigen Signalwege bei der Regulierung der ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten kommt.

Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse wird ein Modell vorgeschlagen, bei dem die fMLP-vermittelte Induktion der ROS-Produktion durch parallele Signalwege, bei denen zum einen die Lipidkinaseaktivität und zum anderen Protein-Protein-Interaktionen und möglicherweise die Proteinkinaseaktivität von PI3K γ eine Rolle spielt, reguliert wird.

7 Literaturverzeichnis

- Adomeit, A., Graness, A., Gross, S., Seedorf, K., Wetzker, R., Liebmann, C., 1999, Bradykinin B(2) receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in COS-7 cells requires dual signaling via both protein kinase C pathway and epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cell Biol* 19, 5289-5297.
- Ali, K., Bilancio, A., Thomas, M., Pearce, W., Gilfillan, A.M., Tkaczyk, C., Kuehn, N., Gray, A., Giddings, J., Peskett, E., Fox, R., Bruce, I., Walker, C., Sawyer, C., Okkenhaug, K., Finan, P., Vanhaesebroeck, B., 2004, Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. *Nature* 431, 1007-1011.
- Alvarez, B., Garrido, E., Garcia-Sanz, J.A., Carrera, A.C., 2003, Phosphoinositide 3-kinase activation regulates cell division time by coordinated control of cell mass and cell cycle progression rate. *J Biol Chem* 278, 26466-26473.
- Arcaro, A., Volinia, S., Zvelebil, M.J., Stein, R., Watton, S.J., Layton, M.J., Gout, I., Ahmadi, K., Downward, J., Waterfield, M.D., 1998, Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. *J Biol Chem* 273, 33082-33090.
- Asehnoune, K., Strassheim, D., Mitra, S., Yeol Kim, J., Abraham, E., 2005, Involvement of PKCalpha/beta in TLR4 and TLR2 dependent activation of NF-kappaB. *Cell Signal* 17, 385-394.
- Babior, B.M., 1999, NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464-1476.
- Babior, B.M., Lambeth, J.D., Nauseef, W., 2002, The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397, 342-344.
- Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L., Vogt, P.K., 2005, Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 5, 921-929.
- Bae, S.S., Lee, Y.H., Chang, J.S., Galadari, S.H., Kim, Y.S., Ryu, S.H., Suh, P.G., 1998a, Src homology domains of phospholipase C gamma1 inhibit nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *J Neurochem* 71, 178-185.
- Bae, Y.S., Cantley, L.G., Chen, C.S., Kim, S.R., Kwon, K.S., Rhee, S.G., 1998b, Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273, 4465-4469.
- Balendran, A., Hare, G.R., Kieloch, A., Williams, M.R., Alessi, D.R., 2000, Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. *FEBS Lett* 484, 217-223.
- Barthel, A., Klotz, L.O., 2005, Phosphoinositide 3-kinase signaling in the cellular response to oxidative stress. *Biol Chem* 386, 207-216.
- Bazzi, M.D., Nelsestuen, G.L., 1990, Protein kinase C interaction with calcium: a phospholipid-dependent process. *Biochemistry* 29, 7624-7630.

- Bernstein, H.G., Keilhoff, G., Reiser, M., Freese, S., Wetzker, R., 1998, Tissue distribution and subcellular localization of a G-protein activated phosphoinositide 3-kinase. An immunohistochemical study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44, 973-983.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bondev, A., Rubio, I., Wetzker, R., 1999, Differential regulation of lipid and protein kinase activities of phosphoinositide 3-kinase gamma in vitro. *Biol Chem* 380, 1337-1340.
- Bondeva, T., Pirola, L., Bulgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R., Wymann, M.P., 1998, Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* 282, 293-296.
- Bony, C., Roche, S., Shuichi, U., Sasaki, T., Crackower, M.A., Penninger, J., Mano, H., Puceat, M., 2001, A specific role of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. A regulation of autonomic Ca(2)+ oscillations in cardiac cells. *J Cell Biol* 152, 717-728.
- Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L., Vignais, P., 1990, The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* 29, 11123-11133.
- Brock, C., Schaefer, M., Reusch, H.P., Czupalla, C., Michalke, M., Spicher, K., Schultz, G., Nurnberg, B., 2003, Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Cell Biol* 160, 89-99.
- Bruyninckx, W.J., Comerford, K.M., Lawrence, D.W., Colgan, S.P., 2001, Phosphoinositide 3-kinase modulation of beta(3)-integrin represents an endogenous "braking" mechanism during neutrophil transmatrix migration. *Blood* 97, 3251-3258.
- Camps, M., Ruckle, T., Ji, H., Ardisson, V., Rintelen, F., Shaw, J., Ferrandi, C., Chabert, C., Gillieron, C., Francon, B., Martin, T., Gretener, D., Perrin, D., Leroy, D., Vitte, P.A., Hirsch, E., Wymann, M.P., Cirillo, R., Schwarz, M.K., Rommel, C., 2005, Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 11, 936-943.
- Cantley, L.C., 2002, The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Cantrell, D.A., 2001, Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 114, 1439-1445.
- Carpenter, C.L., Auger, K.R., Duckworth, B.C., Hou, W.M., Schaffhausen, B., Cantley, L.C., 1993, A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol Cell Biol* 13, 1657-1665.
- Carter, P., Bedouelle, H., Winter, G., 1985, Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res* 13, 4431-4443.
- Chapline, C., Cottom, J., Tobin, H., Hulmes, J., Crabb, J., Jaken, S., 1998, A major, transformation-sensitive PKC-binding protein is also a PKC substrate involved in cytoskeletal remodeling. *J Biol Chem* 273, 19482-19489.

- Chen, C., Okayama, H., 1987, High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-2752.
- Chen, L.W., Lin, M.W., Hsu, C.M., 2005, Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils. *J Biomed Sci* 12, 311-319.
- Chen, Q., Powell, D.W., Rane, M.J., Singh, S., Butt, W., Klein, J.B., McLeish, K.R., 2003, Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J Immunol* 170, 5302-5308.
- Chodniewicz, D., Zhelev, D.V., 2003, Chemoattractant receptor-stimulated F-actin polymerization in the human neutrophil is signaled by 2 distinct pathways. *Blood* 101, 1181-1184.
- Condliffe, A.M., Davidson, K., Anderson, K.E., Ellson, C.D., Crabbe, T., Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B., Turner, M., Webb, L., Wymann, M.P., Hirsch, E., Ruckle, T., Camps, M., Rommel, C., Jackson, S.P., Chilvers, E.R., Stephens, L.R., Hawkins, P.T., 2005, Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood* 106, 1432-1440.
- Cox, D.M., Du, M., Guo, X., Siu, K.W., McDermott, J.C., 2002, Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells. *Biotechniques* 33, 267-268, 270.
- Crackower, M. A., G. Y. Oudit, I. Kozieradzki, R. Sarao, H. Sun, T. Sasaki, E. Hirsch, A. Suzuki, T. Shioi, J. Irie-Sasaki, R. Sah, H. Y. Cheng, V. O. Rybin, G. Lembo, L. Fratta, A. J. Oliveirados-Santos, J. L. Benovic, C. R. Kahn, S. Izumo, S. F. Steinberg, M. P. Wymann, P. H. Backx, and J. M. Penninger. 2002. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110: 737-49.
- Curnock, A.P., Logan, M.K., Ward, S.G., 2002, Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology* 105, 125-136.
- Czupalla, C., Culo, M., Muller, E.C., Brock, C., Reusch, H.P., Spicher, K., Krause, E., Nurnberg, B., 2003, Identification and characterization of the autophosphorylation sites of phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem* 278, 11536-11545.
- Dang, P.M., Fontayne, A., Hakim, J., El Benna, J., Perianin, A., 2001, Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol* 166, 1206-1213.
- De Camilli, P., Chen, H., Hyman, J., Panepucci, E., Bateman, A., Brunger, A.T., 2002, The ENTH domain. *FEBS Lett* 513, 11-18.
- Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A., Messing, R.O., 2000, Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L429-438.
- Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M.J., Gout, I., Totty, N.F., Truong, O., Vicendo, P., Yonezawa, K., et al., 1994, PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *Embo J* 13, 522-533.

- Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C., Segal, A.W., Hall, A., 1994, Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 265, 531-533.
- Ding, J., Vlahos, C.J., Liu, R., Brown, R.F., Badwey, J.A., 1995, Antagonists of phosphatidylinositol 3-kinase block activation of several novel protein kinases in neutrophils. *J Biol Chem* 270, 11684-11691.
- Domin, J., Waterfield, M.D., 1997, Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett* 410, 91-95.
- Dong, L.Q., Liu, F., 2005, PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E187-196.
- Dorseuil, O., Quinn, M.T., Bokoch, G.M., 1995, Dissociation of Rac translocation from p47phox/p67phox movements in human neutrophils by tyrosine kinase inhibitors. *J Leukoc Biol* 58, 108-113.
- Drakas, R., Prisco, M., Baserga, R., 2005, A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells. *Proteomics* 5, 132-137.
- Dutil, E.M., Toker, A., Newton, A.C., 1998, Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr. Biol.* 8, 1366-1375
- El Benna, J., Han, J., Park, J.W., Schmid, E., Ulevitch, R.J., Babior, B.M., 1996, Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch Biochem Biophys* 334, 395-400.
- Ellson, C.D., Gobert-Gosse, S., Anderson, K.E., Davidson, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Thuring, J.W., Cooper, M.A., Lim, Z.Y., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Coadwell, J., Chilvers, E.R., Hawkins, P.T., Stephens, L.R., 2001, PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nat Cell Biol* 3, 679-682.
- Erickson, R.W., Malawista, S.E., Garrett, M.C., Van Blaricom, G., Leto, T.L., Curnutte, J.T., 1992, Identification of a thermolabile component of the human neutrophil NADPH oxidase. A model for chronic granulomatous disease caused by deficiency of the p67-phox cytosolic component. *J Clin Invest* 89, 1587-1595.
- Falasca, M., Logan, S.K., Lehto, V.P., Baccante, G., Lemmon, M.A., Schlessinger, J., 1998, Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *Embo J* 17, 414-422.
- Fan, J., Malik, A.B., 2003, Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat Med* 9, 315-321.
- Fontayne, A., Dang, P.M., Gougerot-Pocidalo, M.A., El-Benna, J., 2002, Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 41, 7743-7750.
- Foster, F.M., Traer, C.J., Abraham, S.M., Fry, M.J., 2003, The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci* 116, 3037-3040.

- Foukas, L.C., Beeton, C.A., Jensen, J., Phillips, W.A., Shepherd, P.R., 2004, Regulation of phosphoinositide 3-kinase by its intrinsic serine kinase activity in vivo. *Mol Cell Biol* 24, 966-975.
- Foukas, L.C., Shepherd, P.R., 2004, eIF4E binding protein 1 and H-Ras are novel substrates for the protein kinase activity of class-I phosphoinositide 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 541-549.
- Frey, R.S., Gao, X., Javaid, K., Siddiqui, S.S., Rahman, A., Malik, A.B., 2006, Phosphatidylinositol 3-kinase gamma signaling through PKCzeta induces NADPH oxidase-mediated oxidant generation and NF-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem*.
- Fuhler, G.M., Knol, G.J., Drayer, A.L., Vellenga, E., 2005, Impaired interleukin-8- and GROalpha-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase result in decreased migration of neutrophils from patients with myelodysplasia. *J Leukoc Biol* 77, 257-266.
- Gallicano, G.I., Yousef, M.C., Capco, D.G., 1997, PKC--a pivotal regulator of early development. *Bioessays* 19, 29-36.
- Garcia-Garcia, J., Gomez-Fernandez, J.C., Corbalan-Garcia, S., 2001, Structural characterization of the C2 domain of novel protein kinase Cepsilon. *Eur J Biochem* 268, 1107-1117.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., Superti-Furga, G., 2002, Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Gershoni, J.M., Palade, G.E., 1983, Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* 131, 1-15.
- Guichard, C., Pedruzzi, E., Dewas, C., Fay, M., Pouzet, C., Bens, M., Vandewalle, A., Ogier-Denis, E., Gougerot-Pocidalo, M.A., Elbim, C., 2005, Interleukin-8-induced priming of neutrophil oxidative burst requires sequential recruitment of NADPH oxidase components into lipid rafts. *J Biol Chem* 280, 37021-37032.
- Gupta, N., Scharenberg, A.M., Fruman, D.A., Cantley, L.C., Kinet, J.P., Long, E.O., 1999, The SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) recruits the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase during FcgammaRIIb1-mediated inhibition of B cell receptor signaling. *J Biol Chem* 274, 7489-7494.
- Hannigan, M., Zhan, L., Li, Z., Ai, Y., Wu, D., Huang, C.K., 2002, Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3603-3608.
- Hawkins, P.T., Jackson, T.R., Stephens, L.R., 1992, Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns(4,5)P2 3-OH kinase. *Nature* 358, 157-159.
- Hay, N., 2005, The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* 8, 179-183.

- Hirano, Y., Yoshinaga, S., Ogura, K., Yokochi, M., Noda, Y., Sumimoto, H., Inagaki, F., 2004, Solution structure of atypical protein kinase C PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5. *J Biol Chem* 279, 31883-31890.
- Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F., Wymann, M.P., 2000, Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287, 1049-1053.
- Hirsch, E., Lembo, G., Montrucchio, G., Rommel, C., Costa, C., Barberis, L., 2006, Signaling through PI3Kgamma: a common platform for leukocyte, platelet and cardiovascular stress sensing. *Thromb Haemost* 95, 29-35.
- Honey, S., Schneider, B.L., Schieltz, D.M., Yates, J.R., Futcher, B., 2001, A novel multiple affinity purification tag and its use in identification of proteins associated with a cyclin-CDK complex. *Nucleic Acids Res* 29, E24.
- Hoyal, C.R., Gutierrez, A., Young, B.M., Catz, S.D., Lin, J.H., Tschlis, P.N., Babior, B.M., 2003, Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5130-5135.
- Itoh, T., Takenawa, T., 2002, Phosphoinositide-binding domains: Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling. *Cell Signal* 14, 733-743.
- Iyer, S.S., Pearson, D.W., Nauseef, W.M., Clark, R.A., 1994, Evidence for a readily dissociable complex of p47phox and p67phox in cytosol of unstimulated human neutrophils. *J Biol Chem* 269, 22405-22411.
- Jaken, S., Parker, P.J., 2000, Protein kinase C binding partners. *Bioessays* 22, 245-254.
- Kanai, F., Liu, H., Field, S.J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G.E., Cantley, L.C., Yaffe, M.B., 2001, The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* 3, 675-678.
- Kang, S., Denley, A., Vanhaesebroeck, B., Vogt, P.K., 2006, Oncogenic transformation induced by the p110beta, -gamma, and -delta isoforms of class I phosphoinositide 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1289-1294.
- Kannan, N., Neuwald, A.F., 2005, Did protein kinase regulatory mechanisms evolve through elaboration of a simple structural component? *J Mol Biol* 351, 956-972.
- Kazanietz, M.G., 2002, Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol* 61, 759-767.
- Khwaja, A., 1999, Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* 401, 33-34.
- Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P.H., Downward, J., 1997, Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J* 16, 2783-2793.
- Kitaura, J., Eto, K., Kinoshita, T., Kawakami, Y., Leitges, M., Lowell, C.A., Kawakami, T., 2005a, Regulation of highly cytokinergic IgE-induced mast cell adhesion by Src, Syk, Tec, and protein kinase C family kinases. *J Immunol* 174, 4495-4504.

- Kिताura, J., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Chung, S., Kawakami, Y., Leitges, M., Wu, D., Lowell, C.A., Kawakami, T., 2005b, IgE- and IgE+Ag-mediated mast cell migration in an autocrine/paracrine fashion. *Blood* 105, 3222-3229.
- Knall, C., Worthen, G.S., Johnson, G.L., 1997, Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3052-3057.
- Hunter, T., 1995, When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase. *Cell* 83, 1-4.
- Koyasu, S., 2003, The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* 4, 313-319.
- Krugmann, S., Hawkins, P.T., Pryer, N., Braselmann, S., 1999, Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits. *J Biol Chem* 274, 17152-17158.
- Kulik, G., Klippel, A., Weber, M.J., 1997, Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 17, 1595-1606.
- Kurosu, H., Maehama, T., Okada, T., Yamamoto, T., Hoshino, S., Fukui, Y., Ui, M., Hazeki, O., Katada, T., 1997, Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. *J Biol Chem* 272, 24252-24256.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laffargue, M., Calvez, R., Finan, P., Trifilieff, A., Barbier, M., Altruda, F., Hirsch, E., Wymann, M.P., 2002, Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity* 16, 441-451.
- Lam, K., Carpenter, C.L., Ruderman, N.B., Friel, J.C., Kelly, K.L., 1994, The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by Wortmannin. *J Biol Chem* 269, 20648-20652.
- Lapouge, K., Smith, S.J., Groemping, Y., Rittinger, K., 2002, Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem* 277, 10121-10128.
- Larsson, C., 2006, Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* 18, 276-284.
- Laudanna, C., Mochly-Rosen, D., Liron, T., Constantin, G., Butcher, E.C., 1998, Evidence of zeta protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *J Biol Chem* 273, 30306-30315.
- Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P., Parker, P.J., 1998, Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281, 2042-2045.

- Leevers, S.J., Weinkove, D., MacDougall, L.K., Hafen, E., Waterfield, M.D., 1996, The Drosophila phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *Embo J* 15, 6584-6594.
- Leopoldt, D., Hanck, T., Exner, T., Maier, U., Wetzker, R., Nurnberg, B., 1998, Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J Biol Chem* 273, 7024-7029.
- Leto, T.L., Garrett, M.C., Fujii, H., Nunoi, H., 1991, Characterization of neutrophil NADPH oxidase factors p47-phox and p67-phox from recombinant baculoviruses. *J Biol Chem* 266, 19812-19818.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parsons, R., 1997, PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947.
- Li, Q., Subbulakshmi, V., Fields, A.P., Murray, N.R., Cathcart, M.K., 1999, Protein kinase calpha regulates human monocyte O-2 production and low density lipoprotein lipid oxidation. *J Biol Chem* 274, 3764-3771.
- Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A.V., Wu, D., 2000, Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 287, 1046-1049.
- Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S., Wetzker, R., 1997, Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275, 394-397.
- MacDonald, P.E., Joseph, J.W., Yau, D., Diao, J., Asghar, Z., Dai, F., Oudit, G.Y., Patel, M.M., Backx, P.H., Wheeler, M.B., 2004, Impaired glucose-stimulated insulin secretion, enhanced intraperitoneal insulin tolerance, and increased beta-cell mass in mice lacking the p110gamma isoform of phosphoinositide 3-kinase. *Endocrinology* 145, 4078-4083.
- Maehama, T., Dixon, J.E., 1998, The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273, 13375-13378.
- Maier, U., Babich, A., Nurnberg, B., 1999, Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem* 274, 29311-29317.
- Malbon, C.C., Tao, J., Wang, H.Y., 2004, AKAPs (A-kinase anchoring proteins) and molecules that compose their G-protein-coupled receptor signalling complexes. *Biochem J* 379, 1-9.
- Marcantoni, A., Levi, R.C., Gallo, M.P., Hirsch, E., Alloatti, G., 2006, Phosphoinositide 3-kinase-gamma (PI3Kgamma) controls L-type calcium current (ICa,L) through its positive modulation of type-3 phosphodiesterase (PDE3). *J Cell Physiol* 206, 329-336.
- Marinari, U.M., Nitti, M., Pronzato, M.A., Domenicotti, C., 2003, Role of PKC-dependent pathways in HNE-induced cell protein transport and secretion. *Mol Aspects Med* 24, 205-211.
- Mayo, L.D., Donner, D.B., 2002, The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* 27, 462-467.

- Medkova, M., Cho, W., 1999, Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C- α in its membrane binding and activation. *J Biol Chem* 274, 19852-19861.
- Mineo, C., Ying, Y.S., Chapline, C., Jaken, S., Anderson, R.G., 1998, Targeting of protein kinase Calpha to caveolae. *J Cell Biol* 141, 601-610.
- Mochly-Rosen, D., Gordon, A.S., 1998, Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *Faseb J* 12, 35-42.
- Mortz, E., Vorm, O., Mann, M., Roepstorff, P., 1994, Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biol Mass Spectrom* 23, 249-261.
- Murphy, P.M., Ozcelik, T., Kenney, R.T., Tiffany, H.L., McDermott, D., Francke, U., 1992, A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. *J Biol Chem* 267, 7637-7643.
- Musashi, M., Ota, S., Shiroshta, N., 2000, The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J Hematol* 72, 12-19.
- Naga Prasad, S.V., Jayatilleke, A., Madamanchi, A., Rockman, H.A., 2005, Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 7, 785-796.
- Narita, M., Imai, S., Narita, M., Kasukawa, A., Yajima, Y., Suzuki, T., 2004, Increased level of neuronal phosphoinositide 3-kinase gamma by the activation of mu-opioid receptor in the mouse periaqueductal gray matter: further evidence for the implication in morphine-induced antinociception. *Neuroscience* 124, 515-521.
- Newton, A.C., 2003, Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370, 361-371.
- Ng, T., Squire, A., Hansra, G., Bornancin, F., Prevostel, C., Hanby, A., Harris, W., Barnes, D., Schmidt, S., Mellor, H., Bastiaens, P.I., Parker, P.J., 1999, Imaging protein kinase Calpha activation in cells. *Science* 283, 2085-2089.
- Niggli, V., 2003, Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1619-1638.
- Nishizuka, Y., 1988, The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.
- Nixon, J.B., McPhail, L.C., 1999, Protein kinase C (PKC) isoforms translocate to Triton-insoluble fractions in stimulated human neutrophils: correlation of conventional PKC with activation of NADPH oxidase. *J Immunol* 163, 4574-4582.
- Nombela-Arrieta, C., Lacalle, R.A., Montoya, M.C., Kunisaki, Y., Megias, D., Marques, M., Carrera, A.C., Manes, S., Fukui, Y., Martinez, A.C., Stein, J.V., 2004, Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase gamma during T and B lymphocyte homing. *Immunity* 21, 429-441.

- Oh, E.S., Woods, A., Lim, S.T., Theibert, A.W., Couchman, J.R., 1998, Syndecan-4 proteoglycan cytoplasmic domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate coordinately regulate protein kinase C activity. *J Biol Chem* 273, 10624-10629.
- Orr, J.W., Newton, A.C., 1994, Intrapeptide regulation of protein kinase C. *J Biol Chem* 269, 8383-8387.
- Paclet, M.H., Davis, C., Kotsonis, P., Godovac-Zimmermann, J., Segal, A.W., Dekker, L.V., 2004, N-Formyl peptide receptor subtypes in human neutrophils activate L-plastin phosphorylation through different signal transduction intermediates. *Biochem J* 377, 469-477.
- Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F., Williams, R.L., 2000, Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* 103, 931-943.
- Parekh, D.B., Ziegler, W., Parker, P.J., 2000, Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *Embo J* 19, 496-503.
- Parker, P.J., Parkinson, S.J., 2001, AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C. *Biochem Soc Trans* 29, 860-863.
- Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S.D., Silengo, L., Altruda, F., Wetzker, R., Wymann, M.P., Lembo, G., Hirsch, E., 2004, PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118, 375-387.
- Ponting, C.P., Parker, P.J., 1996, Extending the C2 domain family: C2s in PKCs delta, epsilon, eta, theta, phospholipases, GAPs, and perforin. *Protein Sci* 5, 162-166.
- Poole, A.W., Pula, G., Hers, I., Crosby, D., Jones, M.L., 2004, PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 25, 528-535.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., Seraphin, B., 2001, The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229.
- Puri, K.D., Doggett, T.A., Huang, C.Y., Douangpanya, J., Hayflick, J.S., Turner, M., Penninger, J., Diacovo, T.G., 2005, The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood* 106, 150-157.
- Quinn, M.T., Gauss, K.A., 2004, Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* 76, 760-781.
- Rane, M.J., Carrithers, S.L., Arthur, J.M., Klein, J.B., McLeish, K.R., 1997, Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J Immunol* 159, 5070-5078.

- Reeves, E.P., Dekker, L.V., Forbes, L.V., Wientjes, F.B., Grogan, A., Pappin, D.J., Segal, A.W., 1999, Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils. *Biochem J* 344 Pt 3, 859-866.
- Reif, K., Okkenhaug, K., Sasaki, T., Penninger, J.M., Vanhaesebroeck, B., Cyster, J.G., 2004, Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol* 173, 2236-2240.
- Rhee, S.G., 2001, Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70, 281-312.
- Rickert, P., Weiner, O.D., Wang, F., Bourne, H.R., Servant, G., 2000, Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol* 10, 466-473.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Seraphin, B., 1999, A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030-1032.
- Rodriguez-Borlado, L., Barber, D.F., Hernandez, C., Rodriguez-Marcos, M.A., Sanchez, A., Hirsch, E., Wyman, M., Martinez, A.C., Carrera, A.C., 2003, Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the CD4/CD8 T cell differentiation ratio. *J Immunol* 170, 4475-4482.
- Rodriguez, P., Mitton, B., Kranias, E.G., 2005, Phosphorylation of glutathione-S-transferase by protein kinase C-alpha implications for affinity-tag purification. *Biotechnol Lett* 27, 1869-1873.
- Ron, D., Kazanietz, M.G., 1999, New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *Faseb J* 13, 1658-1676.
- Rondinone, C.M., Carvalho, E., Rahn, T., Manganiello, V.C., Degerman, E., Smith, U.P., 2000, Phosphorylation of PDE3B by phosphatidylinositol 3-kinase associated with the insulin receptor. *J Biol Chem* 275, 10093-10098.
- Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R.G., Oliveira-dos-Santos, A.J., Stanford, W.L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Kozieradzki, I., Joza, N., Mak, T.W., Ohashi, P.S., Suzuki, A., Penninger, J.M., 2000, Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 287, 1040-1046.
- Sasaki, T., Suzuki, A., Sasaki, J., Penninger, J.M., 2002, Phosphoinositide 3-kinases in immunity: lessons from knockout mice. *J Biochem (Tokyo)* 131, 495-501.
- Sato, M., Moroi, K., Nishiyama, M., Zhou, J., Usui, H., Kasuya, Y., Fukuda, M., Kohara, Y., Komuro, I., Kimura, S., 2003, Characterization of a novel *C. elegans* RGS protein with a C2 domain: evidence for direct association between C2 domain and Galphag subunit. *Life Sci* 73, 917-932.
- Schagger, H., Aquila, H., Von Jagow, G., 1988, Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem* 173, 201-205.

- Scheid, M.P., Lauener, R.W., Duronio, V., 1995, Role of phosphatidylinositol 3-OH-kinase activity in the inhibition of apoptosis in haemopoietic cells: phosphatidylinositol 3-OH-kinase inhibitors reveal a difference in signalling between interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Biochem J* 312 (Pt 1), 159-162.
- Schimanski, B., Nguyen, T.N., Gunzl, A., 2005, Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot Cell* 4, 1942-1950.
- Schmidt, E.K., Fichelson, S., Feller, S.M., 2004, PI3 kinase is important for Ras, MEK and Erk activation of Epo-stimulated human erythroid progenitors. *BMC Biol* 2, 7.
- Selvatici, R., Falzarano, S., Mollica, A., Spisani, S., 2006, Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 534, 1-11.
- Selvatici, R., Falzarano, S., Traniello, S., Pagani Zecchini, G., Spisani, S., 2003, Formylpeptides trigger selective molecular pathways that are required in the physiological functions of human neutrophils. *Cell Signal* 15, 377-383.
- Servant, G., Weiner, O.D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J.W., Bourne, H.R., 2000, Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* 287, 1037-1040.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996, Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Sipeki, S., Bander, E., Parker, P.J., Farago, A., 2006, PKC α reduces the lipid kinase activity of the p110 α /p85 α PI3K through the phosphorylation of the catalytic subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 122-125.
- Sly, L.M., Rauh, M.J., Kalesnikoff, J., Buchse, T., Krystal, G., 2003, SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp Hematol* 31, 1170-1181.
- Song, X., Xu, W., Zhang, A., Huang, G., Liang, X., Virbasius, J.V., Czech, M.P., Zhou, G.W., 2001, Phox homology domains specifically bind phosphatidylinositol phosphates. *Biochemistry* 40, 8940-8944.
- Spisani, S., Falzarano, S., Traniello, S., Nalli, M., Selvatici, R., 2005, A 'pure' chemoattractant formylpeptide analogue triggers a specific signalling pathway in human neutrophil chemotaxis. *Febs J* 272, 883-891.
- Stephens, L., T. Jackson, and P. T. Hawkins. 1993. Synthesis of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in permeabilized neutrophils regulated by receptors and G-proteins. *J Biol Chem* 268: 17162-72.
- Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A.S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., Hawkins, P.T., 1997, The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89, 105-114.

- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B., et al., 1995, Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269, 690-693.
- Stoyanova, S., Bulgarelli-Leva, G., Kirsch, C., Hanck, T., Klinger, R., Wetzker, R., Wymann, M.P., 1997, Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma: structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem J* 324 (Pt 2), 489-495.
- Suire, S., Coadwell, J., Ferguson, G.J., Davidson, K., Hawkins, P., Stephens, L., 2005, p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr Biol* 15, 566-570.
- Suire, S., Hawkins, P., Stephens, L., 2002, Activation of phosphoinositide 3-kinase gamma by Ras. *Curr Biol* 12, 1068-1075.
- Tan, S.L., Parker, P.J., 2003, Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem J* 376, 545-552.
- Tang, X., Downes, C.P., 1997, Purification and characterization of Gbetagamma-responsive phosphoinositide 3-kinases from pig platelet cytosol. *J Biol Chem* 272, 14193-14199.
- Toker, A., Newton, A.C., 2000, Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 275, 8271-8274.
- Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J.A., Shaw, G., Lefkowitz, R.J., 1994, Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 269, 10217-10220.
- Van Lint, J., Van Damme, J., Billiau, A., Merlevede, W., Vandenheede, J.R., 1993, Interleukin-8 activates microtubule-associated protein 2 kinase (ERK1) in human neutrophils. *Mol Cell Biochem* 127-128, 171-177.
- Vanhaesebroeck, B., Alessi, D.R., 2000, The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3, 561-576.
- Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B., Foukas, L.C., 2005, Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* 30, 194-204.
- Vanhaesebroeck, B., Higashi, K., Raven, C., Welham, M., Anderson, S., Brennan, P., Ward, S.G., Waterfield, M.D., 1999, Autophosphorylation of p110delta phosphoinositide 3-kinase: a new paradigm for the regulation of lipid kinases in vitro and in vivo. *Embo J* 18, 1292-1302.
- Vanhaesebroeck, B., Leivers, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., Waterfield, M.D., 2001, Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70, 535-602.
- Vanhaesebroeck, B., Welham, M.J., Kotani, K., Stein, R., Warne, P.H., Zvelebil, M.J., Higashi, K., Volinia, S., Downward, J., Waterfield, M.D., 1997, P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4330-4335.
- Ventura, C., Maioli, M., 2001, Protein kinase C control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 11, 243-267.

- Vieira, J., Messing, J., 1987, Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* 153, 3-11.
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Brown, R.F., Traynor-Kaplan, A.E., Heyworth, P.G., Prossnitz, E.R., Ye, R.D., Marder, P., Schelm, J.A., Rothfuss, K.J., et al., 1995, Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 154, 2413-2422.
- Voigt, P., Brock, C., Nürnberg, B., Schaefer, M., 2005, Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Biol Chem* 280, 5121-5127.
- Voigt, P., Dorner, M.B., Schaefer, M., 2006, Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J Biol Chem* 281, 9977-9986.
- Waki, K., Inanami, O., Yamamori, T., Nagahata, H., Kuwabara, M., 2006, Involvement of protein kinase Cdelta in the activation of NADPH oxidase and the phagocytosis of neutrophils. *Free Radic Res* 40, 359-367.
- Walker, E.H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L., Williams, R.L., 1999, Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* 402, 313-320.
- Wang, Q., Li, N., Wang, X., Kim, M.M., Evers, B.M., 2002, Augmentation of sodium butyrate-induced apoptosis by phosphatidylinositol 3'-kinase inhibition in the KM20 human colon cancer cell line. *Clin Cancer Res* 8, 1940-1947.
- Wang, T., Penttyala, S., Elliott, J.T., Dowal, L., Gupta, E., Rebecchi, M.J., Scarlata, S., 1999, Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C-beta1 and -beta2 with activated Galphaq subunits: an alternative function for C2-signaling modules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7843-7846.
- Ward, S.G., 2004, Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation? *Trends Immunol* 25, 67-74.
- Webb, L.M., Vigorito, E., Wymann, M.P., Hirsch, E., Turner, M., 2005, Cutting edge: T cell development requires the combined activities of the p110gamma and p110delta catalytic isoforms of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 175, 2783-2787.
- Weinkove, D., Neufeld, T.P., Twardzik, T., Waterfield, M.D., Leivers, S.J., 1999, Regulation of imaginal disc cell size, cell number and organ size by *Drosophila* class I(A) phosphoinositide 3-kinase and its adaptor. *Curr Biol* 9, 1019-1029.
- Welch, H.C., Coadwell, W.J., Stephens, L.R., Hawkins, P.T., 2003, Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett* 546, 93-97.
- Wetzker, R., 2004, Irrungen und Perspektiven der Phosphoinositid 3-Kinase Forschung., 2004, *BIOspektrum* 5, 1-3
- Wong, W., Scott, J.D., 2004, AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 959-970.

- Wurmser, A.E., Gary, J.D., Emr, S.D., 1999, Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways. *J Biol Chem* 274, 9129-9132.
- Wymann, M.P., Bjorklof, K., Calvez, R., Finan, P., Thomast, M., Trifilieff, A., Barbier, M., Altruda, F., Hirsch, E., Laffargue, M., 2003, Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy. *Biochem Soc Trans* 31, 275-280.
- Wymann, M.P., Pirola, L., 1998, Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436, 127-150.
- Yamamori, T., Inanami, O., Nagahata, H., Kuwabara, M., 2004, Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47(phox) by controlling cPKC/PKCdelta but not Akt. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 720-730.
- Yao, R., Cooper, G.M., 1995, Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267, 2003-2006.
- Ye, R.D., Boulay, F., 1997, Structure and function of leukocyte chemoattractant receptors. *Adv Pharmacol* 39, 221-289.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bei folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

- K. Lehmann, L. Karagyozev, A. Pop, J. Müller: Isolation of multimeric protein complexes using TAP-tags., 1st Meeting of the Joint Research Centers, Sonderforschungsbereich 604 and Graduiertenkolleg 768, Jena, 25-2th September 2003
- K. Lehmann, L. Karagyozev, K. Landgraf, K. Ullrich, R. Wetzker, J. Müller: Isolation of PI3K γ associated multifunctional protein complexes., 4th Dubrovnik Signaling Conference, Cavtat/Dubrovnik, Croatia, 25-27th May 2004
- K. Lehmann, L. Karagyozev, K. Landgraf, K. Ullrich, R. Wetzker, J. Müller: Isolation of PI3K γ associated multifunctional protein complexes., STS Meeting "Signal Transduction – Receptors, Mediators and Genes, Weimar, 25-27th November 2004
- K. Lehmann: Entschlüsselung von Signaltransduktionswegen durch die Beschreibung von Proteininteraktionen am Beispiel von PI3K γ ., Tag der Nachwuchswissenschaftler des FZL, Jena, 27. Juni 2005

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich bei ihrer Ausführung unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Wetzker danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für molekulare Zellbiologie der FSU Jena anfertigen zu dürfen. Des Weiteren danke ich ihm für seine wissenschaftliche Förderung und stete Diskussionsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Jörg Müller für seine uneingeschränkte Unterstützung und Ermutigung. Seine methodischen Anregungen, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und das kritische Lesen des Manuskripts haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Oelmüller und der Arbeitsgruppe des Lehrstuhles für Pflanzenphysiologie möchte ich für die Möglichkeit, die Einführung und wissenschaftliche Begleitung der massenspektrometrischen Messungen danken.

Herrn Prof. Dr. Liebmann danke ich für die Überlassung der PKC α -Mutanten und PKC-Antikörper.

Herrn Prof. Dr. Norgauer danke ich für seine wissenschaftliche Unterstützung und die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Ein herzlicher Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe des Institutes für molekulare Zellbiologie für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die immerwährende Hilfsbereitschaft sowie methodische und wissenschaftliche Problemdiskussionen. Insbesondere Philipp Scroblin und Kathrin Landgraf danke ich für die enge Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und für ihre unendliche Geduld, die Ermutigung in Zeiten der Frustration und die Förderung meines Studiums herzlich bedanken. Meinem Freund Michael danke ich dafür, dass er mir immer unterstützend zur Seite stand und mir in manch verzweifelter Lage, Zuversicht und Gelassenheit schenkte. Ein Lächeln ist oft das Wesentliche (Antoine de Saint-Exupéry).

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, Literatur und persönlichen Mitteilungen angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit noch an keiner anderen Hochschule eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ist mir bekannt.

Jena, 5. Juni 2006

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Katja Lehmann
Geburtsdatum	Karl-Marx-Stadt
Wohnort	Talstraße 72, 07743, Jena
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1982 - 1984	Polytechnischer Oberschule „Albert Schweitzer“, Chemnitz
1984 – 1988	Erweiterte Polytechnischer Oberschule „M. I. Kalinin“, Chemnitz
1988 - 1990	Kinder- und Jugendsportschule „Emil Wallner“, Chemnitz
1990 – 1994	Georgius-Agricola-Gymnasium, Chemnitz

Studium

10/1994 – 05/1999	Biologie-Diplomstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Spezialisierung: Allgemeine Zoologie Biochemie Mikrobiologie Neurobiologie
06/1999 – 06/2000	Diplomarbeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Fachbereich: medizinische Neurobiochemie Thema: „Serotoninuntersuchungen an Thrombozyten bei psychiatrischen Patienten mit Angst- und Zwangssyndromen – pharmakokinetische Aspekte der Serotoninwiederaufnahmehemmung“

Beruflicher Werdegang

08/2000 – 06/2001	wissenschaftl. Mitarbeiterin bei der Jena Bioscience GmbH
07/2001 - 07/2002	wissenschaftl. Mitarbeiterin am Hans-Knöll-Institut Jena Abteilung: Zell- und Molekularbiologie
08/2002 – 09/2005	Promotion an der medizinischen Fakultät der FSU Jena Institut für molekulare Zellbiologie Thema: „Charakterisierung PI3K γ -assoziierter Proteinkomplexe zur funktionellen Beschreibung von Signaltransduktionsprozessen im Immunsystem“
10/2005 – dato	wissenschaftl. Mitarbeiterin am Klinikum der FSU Jena Abteilung: experimentelle Dermatologie

Jena, im Juni 2006

Katja Lehmann